



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE RSM_M, UN PARÁLOGO
DE RSM_A, DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INP-43**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Miguel Enrique Gaona Guzman

TUTOR:

Dr. Miguel Cocotl Yañez

Miembros del comité asesor:

Dr. Eduardo Bonilla Espinosa

Dra. Ruth Edith Martin Fuentes

Dra. Tanya Plett Torres

Dr. Genaro Jimenez Reyes



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice.

Resumen	1
Glosario	2
1 Introducción ,.....	3
1.1 Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1 Biología y Ecología.....	3
1.2 Los sistemas de <i>Quorum sensing</i>	4
1.3 Regulación post-transcripcional por el sistema Csr/Rsm.....	5
1.4 Factores de virulencia regulados por el sistema Rsm.	9
1.4.1 Elastasa.	9
1.4.2 Píocianina.	10
1.4.3 Ramnolípidos.	12
2 Antecedentes	14
3 Objetivos	15
3.1 Objetivo general.	15
3.2 Objetivos particulares.	15
4 Hipótesis	15
5 Material y método	15
5.1 Cepas plásmidos, vectores y oligonucleótidos.....	15
5.2 Búsqueda de las secuencias del sistema Rsm en la cepa INP-43.....	20
5.3 Construcción de los plásmidos pMErsmM y pUCrsmM.....	21
5.4 Construcción de los plásmidos para la generación de las mutantes.....	22
5.5 Obtención de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
5.6 Cuantificación de píocianina.	24
5.7 Cuantificación de elastasa.....	24
5.8 Cromatografía en capa fina (TLC) de ramnolípidos.....	25
6 Resultados	26
6.1 Búsqueda de los homólogos del sistema Rsm y descubrimiento de RsmM...26	

6.2 Determinación de la función de RsmM en las cepas PAO1 e ID4365 de <i>P. aeruginosa</i>	29
6.2.1 Construcción del plásmido pUCrsmM.....	29
6.2.2 Obtención de las cepas mutantes en <i>rsmA</i> de la cepa PAO1 e ID4365 que sobreexpresan a <i>rsmM</i>	30
6.2.3. Efecto de la sobreexpresión de <i>rsmM</i> en la producción de piocianina en la cepa IDrsmA.....	33
6.2.4 Efecto de la sobreexpresión de <i>rsmM</i> en la producción de piocianina en la cepa PAO1rsmA.	34
6.2.5 Efecto de la sobreexpresión de <i>rsmM</i> en la producción de elastasa en la cepa IDrsmA.....	35
6.2.6 Efecto de la sobreexpresión de <i>rsmM</i> en la producción de elastasa en la cepa PAO1rsmA.....	37
6.2.7 Efecto de la sobreexpresión de <i>rsmM</i> en la producción de ramnolípidos en las mutantes en <i>rsmA</i> de la cepa PAO1 e ID4365.	38
6.3 Efecto de la sobreexpresión de <i>rsmA</i> , <i>rsmN</i> y <i>rsmM</i> en la cepa INP-43 sobre la producción de piocianina.	40
6.3.1 Construcción del plásmido pMErsmM.....	40
6.3.2 Obtención de las cepas que sobreexpresan a <i>rsmA</i> , <i>rsmN</i> y <i>rsmM</i> en <i>P. aeruginosa</i> INP-43.....	41
6.3.3 Cuantificación de piocianina en la cepa INP-43 que sobreexpresa a <i>rsmA</i> , <i>rsmN</i> o <i>rsmM</i>	42
6.4 Construcción de los vectores recombinantes pEX18SmrsmA::Tc, pEX18SmrsmM::Apra y pEX18SmrsmN::Apra.....	44
7 Discusión	46
8 Conclusiones	49
9 Perspectivas	50
10 Bibliografía	50

EL PRESENTE PROYECTO FUE APOYADO POR EL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) IA204221 Y FORDECYT- PRONACES 53366.

Resumen.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, ubicua, patógeno oportunista de importancia clínica, además de ser también considerada principal causante de infecciones nosocomiales en pacientes con quemaduras, y el principal agente etiológico de infecciones de las vías aéreas en pacientes con fibrosis quística, debido a su amplia variedad de factores de virulencia que para este trabajo nos enfocaremos en la piocianina, elastasa y ramnolípidos. Dichos factores de virulencia están regulados transcripcionalmente por los sistemas de *quorum sensing* y a nivel post-transcripcional por el sistema Rsm. El sistema Rsm se compone por dos proteínas de unión a RNA llamadas RsmA y RsmN y cuatro RNAs pequeños no codificantes llamados RsmV, RsmW, RsmY y RsmZ. Este sistema se encuentra ampliamente distribuido en el género *Pseudomonas*, por lo tanto, se ha reportado la presencia de homólogos funcionales de RsmA, el cuál se encarga de regular, en la mayoría de los casos, de manera negativa la traducción de RNAm. Así, RsmA regula la síntesis de diversos factores de virulencia, entre los que presenta *P. aeruginosa* se encuentran la piocianina, elastasa y ramnolípidos, los cuales evaluaremos en este estudio.

En este proyecto identificamos la presencia de un homólogo de RsmA en el aislado clínico *P. aeruginosa* INP-43. De acuerdo con la base de datos del estudio previo de Sobrero y Valverde, este homólogo se ha denominado en otras cepas como RsmM. Sin embargo, esta proteína no ha sido caracterizada experimentalmente. Cabe mencionar que la cepa INP-43 es una mutante no funcional del sistema Las, sistema que también está implicado en la regulación de los factores de virulencia. Por lo tanto, en este proyecto caracterizamos parcialmente la función de RsmM, determinando su función regulatoria en la producción de los factores de virulencia (piocianina, elastasa y ramnolípidos), y sí es que esta regulación varía entre las diferentes cepas de *P. aeruginosa*: INP-43 (aislado clínico), ID4365 (aislado marino) y PAO1 (cepa de referencia). Además de realizar un análisis *in silico* de su estructura.

Glosario.

AHL: Las acil homoserina lactonas (AHL) son moléculas que son sintetizadas y detectadas por sistemas de *Quórum sensing* conocidos como sistemas AHL.

RsaL: RsaL es una proteína reguladora del sistema Las, reprime la transcripción de *lasI* y se auto regula de manera negativa.

Sistema Csr: sistema regulador de almacenamiento de carbono, CsrA es el represor a nivel postranscripcional. Mientras que CsrB, CsrC y MacS son pequeños ARN que se unen a CsrA inhibiendo su actividad.

Sistema Las: es un sistema de *Quórum Sensing* compuesto LasR que es el activador transcripcional y la sintasa LasI que produce el autoinductor N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona.

Sistema Rhl: sistema de *quorum sensing* formado por la el regulador transcripcional RhlR y la sintasa RhlI que produce el autoinductor N-butiril-homoserina lactona.

Sistema Rsm: Sistema de regulación de metabolismo secundario, en la cepa PAO1 y PA14 esta formado por las proteínas de unión a RNA llamadas RsmA y RsmN y cuatro RNAs pequeños no codificantes RsmV, RsmW, RsmY y RsmZ.

Phz: PhzA1-G1, PhzA2-G2, PhzH, PhzM y PhzS, son las enzimas implicadas en la biosíntesis de fenazinas (Phz), siendo PhzS la que produce piocinina como productor final.

PqsE: Es una proteína que interacciona con RhlR para iniciar la transcripción de *phz1* y *phz2* necesarias para la síntesis de piocianina.

1. Introducción.

1.1 Características de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1.1 Biología y Ecología.

Pseudomonas aeruginosa es una gamma proteobacteria, Gram negativa, anaerobia facultativa, ubicua, que se encuentra tanto en ambientes de tierra como acuáticos que han tenido contacto con la actividad humana. Esta bacteria presenta un genoma relativamente amplio de 5.5 a 7 Mb en el cual se encuentran diversos genes que le permiten una gran adaptabilidad y resiliencia a los distintos ambientes, debido a que en su genoma codifica múltiples reguladores, funciones catabólicas que le permiten obtener carbono de distintas fuentes y además sobrevivir en condiciones de anaerobiosis. Además, sintetiza diversos factores de virulencia que le permiten infectar a diferentes tipos de organismos (Rossi *et. al.*, 2020). Su crecimiento se caracteriza por la producción de pigmentos, uno de ellos es la piocianina, un pigmento azul verdoso soluble en agua (Spagnolo *et. al.*, 2021). Entre los organismos que esta bacteria es capaz de infectar encontramos: plantas, insectos, nemátodos y mamíferos (Diggle *et. al.*, 2020).

En el ser humano es de importancia clínica, debido a que provoca infecciones en pacientes inmunocomprometidos, con SIDA, cáncer, fibrosis quística, quemaduras y en algunos casos infecta el tracto urinario. Además, es la bacteria más prevalente en infecciones de individuos con enfermedades de las vías aéreas (Iglewski *et. al.*, 1996).

Una de las principales razones que permiten que esta bacteria provoque infecciones nosocomiales se debe a su gran capacidad adaptativa que le permite formar reservorios en superficies húmedas e incluso en superficies secas. Se adhiere a superficies húmedas mediante la formación de biopelículas por medio de la secreción de exopolisacáridos, además de su capacidad para resistir algunos antimicrobianos. Se pueden encontrar estos reservorios de *P. aeruginosa* en equipo médico, diferentes tipos de sondas, endoscopios, tubos,

catéteres y ventiladores, así como el agua o superficies de baños, tinas y soluciones salinas. (Spagnolo *et. al.*, 2021).

Además de su adaptabilidad, *P. aeruginosa*, presenta una amplia resistencia a antibióticos, y también cuenta con una extensa variedad de factores de virulencia que usa como arsenal para infectar y colonizar a su hospedero, entre los cuales encontramos la producción de fenazinas como la piocianina, la elastasa y los ramnolípidos, entre otros (Newman *et. al.*, 2017). La producción de estos factores de virulencia está regulada a nivel transcripcional por los sistemas de *quórum sensing* y a nivel post-transcripcional por el sistema Rsm (Lapouge *et. al.*, 2008).

1.2 Los sistemas de *quorum sensing*.

Las bacterias actúan de manera coordinada cuando se encuentran en un conjunto multicelular para desarrollar un comportamiento colectivo mediante la comunicación célula a célula, este proceso celular coordinado se conoce como *quórum sensing* (QS) (Mukherjee *et. al.*, 2019) y se puede dar con bacterias de la misma especie o con otras especies (Miller *et. al.*, 2001). El QS involucra pequeñas moléculas señal producidas por las bacterias, conocidas como autoinductores (AI), que son secretadas al medio, una vez que hay mayor cantidad de bacterias, y por lo tanto mayor acumulación de AI, se rebasa el umbral y los AI entran nuevamente a las bacterias, en donde se unen a un regulador transcripcional para activarlo y de esta manera permitir la expresión de los genes blanco (Zhi Li & Satish K Nair 2012).

Las bacterias Gram negativas presentan un tipo de sistema de QS característico, basado en la síntesis y detección de acil-homoserina lactona (AHL), conocidos como sistemas de AHL (Miller *et. al.*, 2001). En *P. aeruginosa* se han descrito dos sistemas de QS de este tipo, conocidos como los sistemas Las y Rhl. El sistema Las está compuesto por LasI que es la sintasa de N-3-oxodecanoil-homoserina-lactona (3-oxo-C12-HSL), y el regulador transcripcional LasR que se une al 3-oxo-C12-HSL. El sistema Rhl está compuesto por la sintasa de N-butanoil homoserina lactona (C4-HSL) RhII, y el regulador transcripcional RhIR que se une a C4-HSL. Los sistemas Las y Rhl se encargan de regular de manera directa o indirecta aproximadamente el

10% de los genes de *P. aeruginosa*, de los cuales algunos corresponden a la formación de biopelícula (Veesenmeyer *et. al.*, 2009), la motilidad tipo *swarming*, adhesión, producción de bombas de eflujo y las interacciones patógeno-hospedero (Williams *et. al.*, 2009). Los sistemas Las y Rhl funcionan de manera jerárquica ya que la transcripción de *RhIR* es inducida por LasR, y a su vez LasR activa la expresión de *LasI*, que como se mencionó, sintetiza 3-oxo-C12-HSL. El aumento de 3-oxo-C12-HSL provoca una retroalimentación positiva activando a LasR quien controla positivamente la expresión de *rhIR* y *rhlI*, por lo que el sistema Rhl es regulado por el sistema Las. Para mantener el balance de la producción de 3-oxo-C12-HSL, la unión LasR/3-oxo-C12-HSL, y contrarrestar la retroalimentación positiva de LasR/3-oxo-C12-HSL, LasR activa la transcripción de *rsaL* que codifica para el represor RsaL. RsaL reprime la transcripción de *lasI* y *rsaL* uniéndose en el promotor bidireccional de *lasI-rsaL*. RsaL no sólo regula al sistema Las sino que también puede regular otros blancos al unirse a promotores de genes que participan en la producción de piocianina y cianuro (Williams *et. al.*, 2009).

Se han encontrado cepas mutantes no funcionales de *lasR* que solo requieren de *rhIR*, por lo tanto, en estos casos se considera que el QS depende del sistema Rhl. Además, interesantemente no se ve afectada la virulencia en dichas cepas, y la función de LasR es sustituida por RhIR quien mantiene la expresión de los factores de virulencia dependientes de QS. Un comportamiento similar se ha reportado cuando se encuentran en condiciones de estrés como bajas condiciones de fósforo en el que se observa mayor actividad de RhIR incluso con el sistema Las totalmente ausente (Lee *et. al.*, 2015, Soto-Aceves *et. al.*, 2021).

1.3 Regulación post-transcripcional por el sistema Csr/Rsm.

El sistema Rsm (regulación de metabolismo secundario, por su acrónimo en inglés) es un sistema de regulación post-transcripcional que se encuentra altamente conservado en *P. aeruginosa* (Lapouge *et. al.*, 2008). Este sistema es homólogo del sistema Csr (regulador de almacenaje de carbono, por su acrónimo en inglés) de *E. coli*, que se compone de CsrA, una proteína que se une a RNA mensajero (RNAm) en una región que se traslapa con el sitio Shine-

Dalgarno (SD) compitiendo con el ribosoma e impidiendo la traducción (Yang *et. al.*, 1996). La acción de CsrA es regulada negativamente por tres pequeños RNAs (sRNA) no codificantes, CsrB, CsrC y MacS los cuales presentan múltiples sitios de unión a CsrA, que les permiten secuestrar a esta proteína, impidiendo que CsrA se pueda unir a los RNAm, permitiendo la traducción (Erik Holmqvist y Jörg Vogel 2013). El sistema CsrA se encarga del control de distintos procesos celulares entre los que podemos nombrar la motilidad, la formación de biofilm y la síntesis de polisacáridos (Sobrero & Valverde 2020).

En *P. aeruginosa* se sabe que existe un homólogo de CsrA, RsmA que presenta un mecanismo similar a CsrA. RsmA se une a RNAm cerca del sitio de unión al ribosoma que se traslapa con la región SD impidiendo así la traducción. Además, el sistema Rsm está compuesto por 4 pequeños RNA no codificantes (sRNA): RsmV, RsmZ, RsmW y RsmY que cuentan con sitios de unión a RsmA que les permiten unirse las proteínas diméricas RsmA, secuestrándolas e impidiendo así la unión a los RNAm, permitiendo la traducción. A su vez, la transcripción de estos sRNA está controlada por la proteína cinasa GacA, que forma parte del sistema de doble componente GacS/GacA (Lapouge *et. al.*, 2008). Se ha reportado que al mutar a *rsmA* en *P. aeruginosa* PAO1, se altera la expresión del 9% de sus genes (Borrowes *et. al.*, 2006). Por otro lado, al sobreexpresar a *rsmA* ocurre la reducción de los niveles de factores de virulencia como proteasa, elastasa, piocianina y cianuro de hidrógeno (HCN) (Pessi *et. al.*, 2001). *P. aeruginosa* no solo cuenta con RsmA, sino que presenta una proteína homóloga a RsmA, RsmN, que al mutarla no causa cambios fenotípicos, pero al ser sobreexpresada es capaz de complementar la mutación de RsmA, por lo que se considera que RsmN tiene funciones similares a RsmA, pero un papel secundario en la regulación post-transcripcional (Morris *et. al.*, 2013). Estudios previos han demostrado que RsmA es capaz de regular de manera diferente la producción de factores de virulencia en las diferentes cepas, como se encontró en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* ID4365, una mutante natural en *lasR*. En esta cepa RsmA participa en la regulación de RhIR, regulando de manera positiva la producción de elastasa contrario a lo que ocurre en la cepa PAO1, en donde la elastasa es regulada de manera negativa (figura 1). Se propone que esta diferencia en la

RsmZ. Es importante mencionar que RsmI tiene una menor afinidad por RsmY comparado con RsmA y RsmE. La delección de *rsmA*, *rsmE* y *rsmI*, abate la motilidad tipo *swarming*, pero promueve la formación de biopelícula, aunque comparado con la cepa silvestre la biopelícula es más lábil y se dispersa con mayor facilidad. La razón de este fenotipo se debe al cambio en la expresión de algunos componentes de la biopelícula, los cuales RsmA, RsmE y RsmI regulan de manera redundante o de manera específica. Uno de estos componentes es *lapA*, un gen importante para la adhesión de la biopelícula que parece ser regulado específicamente por RsmE. Por último, RsmA y RsmE son importantes para la colonización de las raíces de las plantas, ya que al mutar a *rsmA* de manera individual la colonización disminuye, y al mutar a *rsmE* en conjunto con *rsmA* la colonización disminuye aún más que la mutante sencilla en *rsmA* (Huertas-Rosales *et. al.*, 20). En *P. syringae*, específicamente en la cepa DC3000, RsmA es llamado CsrA2, al igual que en *P. aeruginosa* y *P. putida* contiene otros homólogos de RsmA, CsrA1 y CsrA3 (RsmE en *P. putida*). La actividad de CsrA3, al igual que RsmA, puede ser contrarrestado por la unión de RsmX1, RsmX5, RsmY y RsmZ. CsrA2 y CsrA3 regulan algunos factores de virulencia de la cepa DC3000, CsrA3 pero no CsrA2 ni CsrA, regula negativamente la síntesis de alginato. En cuanto a la motilidad, la sobreexpresión de *csrA3* disminuye ligeramente la motilidad tipo “swimming”, además, CsrA2 y CsrA3 regulan negativamente la expresión de *syfR* y *syfABC*, disminuyendo la producción de siringfactina, un biosurfactante necesario para la motilidad tipo *swarming* en *P. syringae* DC3000. El efecto de CsrA3 en la producción de siringfactina es mayor que el de CsrA2, mientras que CsrA1 no tiene ningún efecto. Por otro lado, la delección de *csrA3* provoca una disminución en la colonización, sin embargo, la cepa adquiere un fenotipo hipervirulento caracterizado por una exacerbada motilidad tipo *swarming*, mientras que al sobreexpresar a *csrA3* el daño en el tejido es menor pero con una mayor capacidad de colonización (Ferreiro *et. al.*, 2018).

1.4 Factores de virulencia regulados por el sistema Rsm.

1.4.1 Elastasa.

Entre los múltiples factores de virulencia secretados por *P. aeruginosa*, la elastasa ha sido considerado uno de los más importantes en el proceso de patogénesis en la infección pulmonar (Berra *et. al.*, 2010). La elastasa LasB (codificada en el gen *lasB*) es una proteasa clasificada como una metaloproteasa dependiente de zinc de 33 KDa y 301 aminoácidos, implicada en la destrucción de los tejidos, su nombre lo recibe debido a que degrada elastina, capacidad que la distingue del resto de proteasas (Galloway 1991).

Por otro lado, también se sabe que LasA es una proteasa que presenta actividad de elastasa en una cantidad mucho menor comparada con LasB, sin embargo, permite un aumento en la degradación de elastina por *P. aeruginosa* (Kessler *et. al.*, 1997). Se sabe, que tanto LasA como LasB son regulados por LasR (Coin *et. al.*, 1997).

Aunque la función primaria de LasB es la de elastasa, su actividad elastolítica no es muy eficiente, teniendo una menor eficiencia comparada con elastasas de otros organismos, como con la termolisina de *Bacillus*, presentando la cuarta parte de la actividad al compararla con esta. Por otro lado, se ha demostrado que presenta actividad proteolítica, unas 10 veces más que la proteasa alcalina de *P. aeruginosa* cuando se usa la caseína. Se considera a la elastasa de *P. aeruginosa* como una proteasa con actividad elastolítica, y es importante considerar que la degradación de elastina es muy importante para el establecimiento de la infección de *P. aeruginosa* (Galloway 1991).

La elastasa también tiene la capacidad de degradar los tipos de colágeno III y IV, surfactantes, inmunoglobulinas, factores del complemento y citocinas. Esta capacidad de degradación afecta las uniones estrechas celulares y la membrana basal, provocando daño directo al tejido pulmonar. Además, provoca el reclutamiento de neutrófilos en las vías aéreas, y como consecuencia aumenta la inflamación. Por último, también aumenta la susceptibilidad a infecciones futuras, atenuando los mecanismos de defensa

pulmonares a través de la degradación de las proteínas surfactantes (Berra *et. al.*, 2010).

En las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 e ID4365, la producción de elastasa es afectada por RsmA de manera diferente. En la cepa PAO1 RsmA regula negativamente la síntesis de elastasa ya que la sobreexpresión de *rsmA* disminuye su producción, pero su mutación no la afecta. Por otro lado, en la cepa ID4365 mutante natural en *lasR*, ocurre lo contrario, RsmA actúa sobre RhlR regulando positivamente la síntesis de elastasa (Heurlier *et. al.*, 2004, Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020).

1.4.2 Piocianina.

La piocianina es un pigmento color azul-verdoso producido por *P. aeruginosa* como metabolito secundario, este pigmento forma parte de un amplio grupo de compuestos heterocíclicos nitrogenados conocidos como fenazinas, con propiedades antimicrobianas que le permite competir con otros microorganismos en su ambiente natural, además participa en la adquisición de hierro, transporte de electrones y formación de biopelícula (Pierson *et. al.*, 2010). Por otro lado, también es un importante factor de virulencia que se asocia con infecciones graves en los pacientes con fibrosis quística (Hunter *et. al.*, 2012). La piocianina presenta la propiedad de encontrarse en su estado oxidado y reducido, es decir, es un zwitterion. Esta característica le permite interactuar con el oxígeno molecular y generar especies reactivas de oxígeno (ROS, por su acrónimo en inglés) tales como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$). La acumulación de estas ROS al interior de la célula causan daño celular provocando necrosis epitelial y disminuyendo el movimiento ciliar, lo que lleva a la reducción del flujo mucociliar traqueal. Sin embargo, a pesar del daño que provoca en el hospedero y las propiedades antimicrobianas de la piocianina, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de evitar sus efectos (Berra *et. al.*, 2010).

La piocianina es sintetizada a partir del corismato, que es modificado para obtener un compuesto tricíclico, mediante las enzimas codificadas en los dos operones reiterados *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phz1*) y *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phz2*) y los genes *phzH*, *phzM* y *phzS* que codifican para proteínas accesorias

para la síntesis de piocianina y otras fenazinas. La síntesis de piocianina es regulada por los sistemas de QS LasR y RhIR, y el sistema Rsm (Lau *et. al.*, 2004, Pessi *et. al.*, 2001, Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020). La síntesis de la piocianina depende de los sistemas de QS, los cuales se activan en la fase exponencial con la síntesis de AHL, continúa en la fase exponencial tardía con RhIR y PqsE. RhIR controla directamente la expresión de los operones *phz1* y *phz2*, y PqsE debe estar presente para inducir la transcripción de cada operón (Higgins *et. al.*, 2018, Mavrodi *et. al.*, 2001). La expresión de los operones *phz* permite la conversión del corismato en ácido carboxílico de fenazina (PCA), posteriormente, el PCA es modificado y se obtienen 3 productos: la piocianina, que se obtiene en mayor cantidad y su producción está dada por PhzM que produce un intermediario que finalmente es modificado hasta piocianina por PhzS, en segundo lugar se produce fenazina-carboxamida cuya síntesis involucra a PhzH y el tercer producto es la hidroxifenazina, cuya síntesis involucra únicamente a PhzS (figura 2) (Mavrodi *et. al.*, 2001, Dong *et. al.*, 2019). Es importante mencionar que el sistema GacA está implicado en menor medida en la síntesis de piocianina, se ha reportado que la mutación de *gacA* disminuye su producción (Lau *et. al.*, 2004).

De acuerdo con estudios previos en las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 e ID4365 el efecto de RsmA en la síntesis de piocianina ocurre de manera similar, en ambos casos la sobreexpresión de *rsmA* provoca una disminución en la producción de piocianina y su mutación un aumento, de tal manera que en ambos casos la producción de piocianina es regulada de manera positiva (Pessi *et. al.*, 2001, Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020).

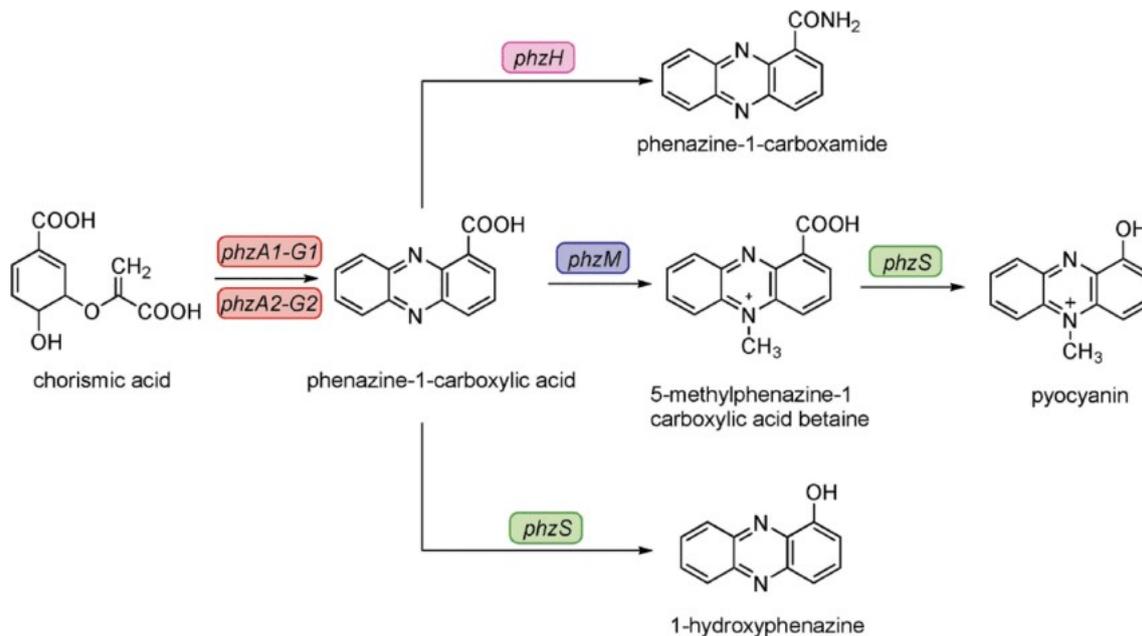


Figura 2. Biosíntesis de fenazinas en *P. aeruginosa*: el ácido corísmico es transformado en ácido fenazina-1-carboxílico por las proteínas PhzA-G. Después, el ácido fenazina-1-carboxílico es transformado en distintas fenazinas por las enzimas PhzH, PhzS y PhzM, respectivamente. El producto del ácido carboxílico de metil-fenazina betaina es posteriormente transformado en pirocianina por la enzima PhzS (Dong *et. al.*, 2019).

1.4.3 Ramnolípidos.

P. aeruginosa produce compuestos con propiedades surfactantes conocidos como ramnolípidos. Los ramnolípidos son moléculas anfipáticas compuestas por un ácido graso (parte hidrofóbica) y una ramnosa (parte hidrofílica) en el caso de los mono-ramnolípidos y dos ramnosas en el caso de los di-ramnolípidos (Soberón *et. al.*, 2005).

Los ramnolípidos son biosurfactantes, estos permiten la degradación de sustratos poco solubles. Por otro lado, se consideran un factor de virulencia, debido a que participan en la formación de biopelícula, la motilidad tipo *swarming* y la modulación del sistema inmune (Abdel *et. al.*, 2010). Además, confieren ventaja competitiva en el microambiente gracias a las propiedades antimicrobianas contra la mayoría de las bacterias gram positivas y contra algunas gram negativas (Soberón *et. al.*, 2005). Se ha demostrado que los ramnolípidos tienen la capacidad de provocar disminución del flujo mucociliar (Kanthakumar *et. al.*, 1996) y en bajas concentración inhiben la fagocitosis (McClure *et. al.*, 1996). Sin embargo, tienen diversas aplicaciones debido a que son biosurfactantes biodegradables y pueden ser usados como aditivos en los

alimentos, cosméticos, industria farmacéutica (Chong *et. al.*, 2017) además de ser una herramienta de biocontrol de hongos para los cultivos (Monnier *et. al.*, 2018).

Se ha tomado a *P. aeruginosa* como el mejor modelo para estudiar la biosíntesis de ramnolípidos y los genes implicados, debido a que cuenta con las enzimas necesarias para sintetizar los precursores. Los precursores para la síntesis de ramnolípidos son el extremo lipofílico 3-(3-hidroxiálquilalcanoil) alcanoico (HAA) que se puede sintetizar a partir de la vía de ácidos grasos, comenzando con una cadena de 6 carbonos, y el extremo hidrofílico dTDP-L-ramnosa, que se puede obtener a partir de la D-glucosa (Chong *et. al.*, 2017). La síntesis de ramnolípidos sucede en 3 pasos principales comenzando con la síntesis del extremo lipofílico HAA en la que interviene RhIA. Posteriormente, la proteína de unión a membrana ramnosiltransferasa RhIB, transfiere la dTDP-L-ramnosa al HAA, generando así el mono-ramnolípidos, que además es sustrato para la siguiente reacción, en la que RhIC, se encarga de transferir una dTDP-L-ramnosa para finalmente obtener di-ramnolípidos (Soberón-Chávez *et. al.*, 2005). La biosíntesis de ramnolípidos está regulada por los 3 sistemas de QS, Las, Rhl y Pqs. Por otro lado, se sabe que la proteína RsaL es capaz de afectar la biosíntesis a partir de la represión de *lasI* y *lasR*. No obstante, el principal sistema implicado es el sistema Rhl, quien controla directamente la biosíntesis de ramnolípidos, a través del regulador RhIR que activa la transcripción de *rhlAB* iniciando la biosíntesis, este proceso ocurre durante la fase estacionaria (Chong *et. al.*, 2009).

La producción de ramnolípidos en las cepas de *P. aeruginosa* ID4365 y PAO1 es regulada por RsmA de manera similar, de acuerdo con estudios previos se ha encontrado que RsmA es un regulador positivo de la producción de ramnolípidos en ambas cepas (Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020, Heurlier *et. al.*, 2004).

2. Antecedentes.

La cepa INP-43 de *P. aeruginosa* es un aislado clínico de un paciente pediátrico con fibrosis quística, esta cepa sintetiza los factores de virulencia elastasa, piocianina y ramnolípidos. Como se mencionó previamente, estos factores de virulencia son regulados por el sistema de QS Las, sin embargo la cepa INP-43 presenta una mutación sin sentido en el gen *lasR*, por lo que este sistema no es funcional. De esta manera, se propone que, como sucede en la cepa ID4365, la producción de los factores de virulencia dependientes de QS son controlados por el sistema Rhl, tales como la piocianina, elastasa y ramnolípidos. Por otro lado, mediante análisis filogenético se determinó que la cepa INP-43 está emparentada con la cepa PAO1 encontrándose en el mismo clado, a diferencia de la cepa ID4365 que no se encuentra en el mismo clado. Por último, se determinó que esta cepa es virulenta en el modelo de ratón a pesar de no contar con *lasR* (Martínez-Carranza *et. al.*, 2020).

Como se mencionó, RsmA controla la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa*, que en el caso de la cepa PAO1 regula negativamente la producción de piocianina y elastasa (Heurlier *et. al.*, 2004) y de manera positiva la producción de ramnolípidos (Heurlier *et. al.*, 2004). Sin embargo, el control de RsmA sobre la síntesis de los factores de virulencia no es similar en todas las cepas, por ejemplo, en la cepa ID4365 RsmA regula positivamente la producción de elastasa, mientras que la piocianina y los ramnolípidos son regulados de manera positiva al igual que en la cepa PAO1. Es importante mencionar que la cepa ID4365 es de origen ambiental y, similar a la cepa INP-43, también es una mutante natural en *lasR* (Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020).

En el género *Pseudomonas* el sistema Rsm se encuentra altamente conservado, se encuentra en todas las especies de *Pseudomonas*, y entre las especies de *Pseudomonas* se han identificado diferentes homólogos de RsmA, entre ellos RsmM que es específico para *P. aeruginosa* considerado un parálogo específico de esta especie. RsmM comparte dominios estructurales y catalíticos con RsmA, pero a diferencia de RsmA, presenta una región C-terminal extendida que podrían tener una función de interacción proteína-proteína. Por otro lado RsmM no se encuentra en todas las cepas de *P.*

aeruginosa, y solo se ha hallado en análisis pangenómicos (*in silico*) (Sobrero & Valverde 2020). Además, RsmM no se ha caracterizado experimentalmente en ninguna cepa.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Determinar si la proteína RsmM de *P. aeruginosa* INP-43 funciona como un parálogo de RsmA.

3.2 Objetivos particulares.

- 1 Determinar si RsmM funciona como un homólogo funcional de RsmA en las cepas PAO1 e ID4365 de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2 Determinar el efecto de la sobreexpresión de RsmA, RsmN y RsmM en la cepa INP-43 sobre la producción de piocianina.
- 3 Generar los plásmidos para mutar a las proteínas reguladoras del sistema Rsm en la cepa INP-43.

4. Hipótesis.

RsmM al ser un homólogo de RsmA debe tener la capacidad de regular los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, elastasa, ramnolípidos y piocianina, de manera similar a RsmA.

5. Material y métodos.

5.1 Cepas, plásmidos, vectores y oligonucleótidos.

En la tabla 1 se enlistan los oligonucleótidos utilizados y en la tabla 2 se detallan los plásmidos usados en este trabajo, las cepas generadas y las que se encontraban en el laboratorio se muestran en la tabla 3. Las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pUCP20 y sus derivadas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) adicionado con carbenicilina (Cb) 200 µg/mL. Las

cepas mutantes en *rsmA* (PAO1 e ID4365) se cultivaron en medio LB adicionado con antibiótico tetraciclina 120 µg/mL (Tc120), mientras que las transformadas con el plásmido pUCP20 se cultivaron en medio LB adicionado con carbenicilina 200 µg/mL (Cb200). Las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pME6032 se cultivaron en medio LB adicionado con tetraciclina 15 µg/mL (Tc15). Las cepas de *P. aeruginosa* transformadas con el plásmido pME6032 se adiciona al medio LB tetraciclina 120 µg/mL (Tc120), por último a las mutantes en *rsmA* con el plásmido pUCP20 se adicionó al medio LB tetraciclina 120 µg/mL + carbenicilina 200 µg/mL (Cb200/Tc120).

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de Restricción
H3upRsmM	CCAAGCTTGATGGCGACTCTTGCTCAGG	HindIII
RsmM5Apra	GTCGACGGATCCCCGGAATACATGGTGTGACTCC GTTCGG	
RsmM3Apra	GAAGCAGCTCCAGCCTACAGATCTCCTGACTTCG GCGC	
H3downRsmM	CCAAGCTTTGGGTGTTCTCGAATGGGG	HindIII
UPRsmMOE	CGAGAATTCGAAGACGAGCAGTGGGACTA	EcoR1
DownRsmMOE	CGAGAATTCGAAGACGAGCAGTGGGACTA	Xho1
RsmAUpH3	CCAAGCTTGTGCATCGCAACGATTACCT	HindIII
RsmADownH3-bis	CCAAGCTTGAAAGACCGCAACTGTTCGAT	HindIII
RsmA5Tc	GAGGACCGAAGGAGCTAACCAGCATTCTTTCTC CTCAGC	
RsmA3Tc-bis	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGATCAAGAGCCAAA CCATTA	
RsmNUpH3	CCAAGCTTGCATCTGCAACTGTTGTTCTTC	HindIII
RsmN5Tc	GAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTCCGCGTCCTTG CCAGTC	

RsmN3Tc	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGCTGACGAACGG TAGAAAG	
H3downRsmN	CCAAGCTTCTCTCCTGGTAATCGCGTTC	HindIII
FwTc	GGTTAGCTCCTTCGGTCCTC	
RvTc	GCTTCCTCGCTCACTGACTC	
Apra Fw	TATTCCGGGGATCCGTCGAC	
Apra Rv	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes del sistema Rsm.

Plásmido	Características	Referencia
pME6032	Vector para la sobreexpresión de genes	(Heeb <i>et. al.</i> , 2000)
pMErsmA	Plásmido para la sobreexpresión de <i>rsmA</i>	Cocotl-Yanez <i>et. al.</i> , 2020
pMErsmM	Plásmido para la sobreexpresión de <i>rsmM</i>	Este trabajo
pMErsmN	Plásmido para la sobreexpresión de <i>rsmN</i>	Cocotl-Yanez <i>et. al.</i> , 2020
pUCP20	Vector de clonación	(Olsen <i>et. al.</i> , 1982)
pUCrsmA	Plásmido para la sobreexpresión de <i>rsmA</i>	(Cocotl-Yanez <i>et. al.</i> , 2020)
pUCrsmM	Plásmido para la sobreexpresión de <i>rsmM</i>	Este trabajo
pEX18Sm	Vector para reemplazo de genes por recombinación en <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a	(Garcia <i>et. al.</i> , 2021)

	Sm	
pEX18SmrsmA::Tc	Vector para reemplazo de <i>rsmA</i> por recombinación en <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a Tc	este trabajo
pEXSmrsmM::Apra	Vector para reemplazo del gen <i>rsmM</i> por recombinación en <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a Apra	este trabajo
pEX18SmrsmN::Apra	Vector para reemplazo del gen <i>rsmN</i> por recombinación en <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a Apra	este trabajo
Mini-CTX-lux	Plásmido que porta el casete de resistencia a Tc	(Hoang <i>et. al.</i> , 2000)
pIJ773	Plásmido que porta el casete de resistencia a Apra	(Gust <i>et. al.</i> , 2003)

Tabla 2: Plásmidos utilizados para la transformación de las cepas. Apra: apramicina, Sm: estreptomicina, Tc: tetraciclina.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa de referencia	(Stover <i>et. al.</i> , 2000)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1rsmA	Cepa mutante en el gen <i>rsmA</i> , con resistencia a tetraciclina	(Montelongo <i>et. al.</i> , Sometido)
<i>P. aeruginosa</i> ID4365	Cepa silvestre, aislado ambiental	(Manwar <i>et. al.</i> , 2004)
<i>P. aeruginosa</i> IDrsmA	<i>P. aeruginosa</i> cepa ID4365 mutante en <i>rsmA</i> con	(Cocotl <i>et. al.</i> , 2020)

	resistencia a tetraciclina	
<i>P. aeruginosa</i> INP-43	Aislado clínico	(Martínez <i>et. al.</i> , 2020)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> cepa no patógena usada para clonación. <i>supE44 (lacZYA-argF)U196 (80lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Woodcock, <i>et. al.</i> , 1989) MCLAB
<i>P. aeruginosa</i> INP-43/pMErsmA	<i>P. aeruginosa</i> INP-43 con el plásmido pMErsmA que sobreexpresa a <i>rsmA</i>	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> INP-43/pMErsmN	<i>P. aeruginosa</i> INP-43 con el plásmido pMErsmN que sobreexpresa a <i>rsmN</i>	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> INP-43/pMErsmM	<i>P. aeruginosa</i> INP-43 con el plásmido pMErsmM que sobreexpresa a <i>rsmM</i>	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> INP-43/pME6032	<i>P. aeruginosa</i> INP-43 con el plásmido pME6032 (control de plásmido)	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> PAO1rsmA/pUCrsmA	<i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1 mutante en <i>rsmA</i> con el plásmido pUCrsmA que sobreexpresa a <i>rsmA</i>	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> PAO1rsmA/pUCrsmM	<i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1 mutante en <i>rsmA</i> con el plásmido pUCrsmM que sobreexpresa a <i>rsmM</i>	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> PAO1rsmA/pUCP20	<i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1 mutante en <i>rsmA</i> con el	este trabajo

	plásmido pUCP20 (control de plásmido)	
<i>P. aeruginosa</i> IDrsmA/pUCrsmA	<i>P. aeruginosa</i> cepa ID4365 mutante en <i>rsmA</i> con el plásmido pUCrsmA que sobreexpresa <i>rsmA</i> .	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> IDrsmA/pUCrsmM	<i>P. aeruginosa</i> cepa ID4365 mutante en <i>rsmA</i> con el plásmido pUCrsmM que sobreexpresa <i>rsmM</i>	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> IDrsmA/PUCP20	<i>P. aeruginosa</i> cepa ID4365 mutante en <i>rsmA</i> con el plásmido pUCP20 (control de plásmido)	este trabajo

Tabla 3. Lista de cepas generadas y utilizadas.

5.2 Búsqueda de las secuencias del sistema Rsm en la cepa INP-43.

Se realizó una búsqueda de las secuencias homólogas de los genes del sistema Rsm de la cepa de *P. aeruginosa* INP-43 así como las 500 pb que los flanquean en los extremos 5' y 3', en la plataforma <https://pseudomonas.com/>, usando como referencia las secuencias de la cepa de referencia PAO1 previamente descargadas de esta misma base de datos, desde esta plataforma se puede realizar el alineamiento de secuencias usando la herramienta BLAST. Se procedió a realizar el alineamiento de las secuencias para buscar mutaciones entre estas, las secuencias identificadas como homólogas se descargaron de la plataforma y se usaron para diseñar los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se diseñaron desde la página <https://primer3.ut.ee/>. Con esta metodología, se encontraron cada uno de los elementos del sistema Rsm, incluyendo a RsmM, en la cepa INP-43.

5.3 Construcción de los plásmidos pMErsmM y pUCrsmM.

Una vez que se encontró la secuencia de *rsmM* en la cepa INP-43, se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para amplificarlo (tabla 1). Posteriormente se procedió a extraer el DNA de la cepa INP-43, usando el kit para extracción de DNA cromosomal “thermo Scientific GeneJET genomic DNA purification kit” basándose en el protocolo establecido por el proveedor. Usando el DNA extraído y los oligonucleótidos que se diseñaron previamente, se realizó la amplificación de *rsmM*, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se empleó la enzima de alta fidelidad “Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase” en el termociclador “BIO-RAD T100 Thermal cycler” en gradiente de temperatura de (56°C, 58°C y 60°C) para determinar a qué temperatura amplificaban estos genes, obteniendo que se podían amplificar todos a 60°C.

Una vez obtenido el amplificado de *rsmM*, se purificó por electroforesis, se cortó la banda correspondiente a *rsmM* de 669 pb y se purificó con el kit “WIZARD SV Gel and PCR Clean-Up System” de acuerdo con el protocolo estándar del laboratorio que se describe a continuación:

Se colocó el fragmento de gel con la banda de DNA en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se agregaron 10 µL de solución de unión a membrana por cada 10 mg de fragmento de gel. Se mezcló con el vortex y se incubó entre 50-65°C hasta disolver el gel. Se insertó la columna en el tubo de recolección. Se transfirió la mezcla disuelta a la minicolumna ensamblada. Se incubó por 1 minuto y después se centrifugó a 14500 rpm. Se desechó el filtrado y se reinsertó la columna en el tubo de recolección. Se agregaron 700 µL de solución de lavado de membrana (con etanol), se centrifugó a 14500 rpm (revoluciones por minuto) por 1 minuto. Se desechó el filtrado y se reinsertó la minicolumna en el tubo colector. Se repitió el paso anterior con 500 µL de solución de lavado de membrana. Se centrifugó a 14500 rpm por 5 minutos después se vació el tubo colector y se volvió a insertar la columna ensamblada por un minuto para permitir la evaporación del etanol residual. Se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 50 µL de agua estéril libre de nucleasas a la minicolumna. Posteriormente se incubó a

temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó a 14500 rpm por un minuto. Por último, se desechó la columna y el DNA obtenido en el tubo de microcentrifuga se almacenó a -2°C. El fragmento fue digerido con las enzimas EcoR1 y Xho1 y purificado nuevamente por columna.

Finalmente, se realizó la restricción del vector pME6032 con las enzimas EcoR1 y Xho1 para ligarlo al gen *rsmM*, las ligaciones se realizaron con la enzima DNA ligasa T4 (Promega). Se siguió este mismo proceso para ligar a *rsmM* en el vector pUCP20 usando las enzimas EcoR1 y HindIII generando el plásmido pUCrsmM (figura 3).

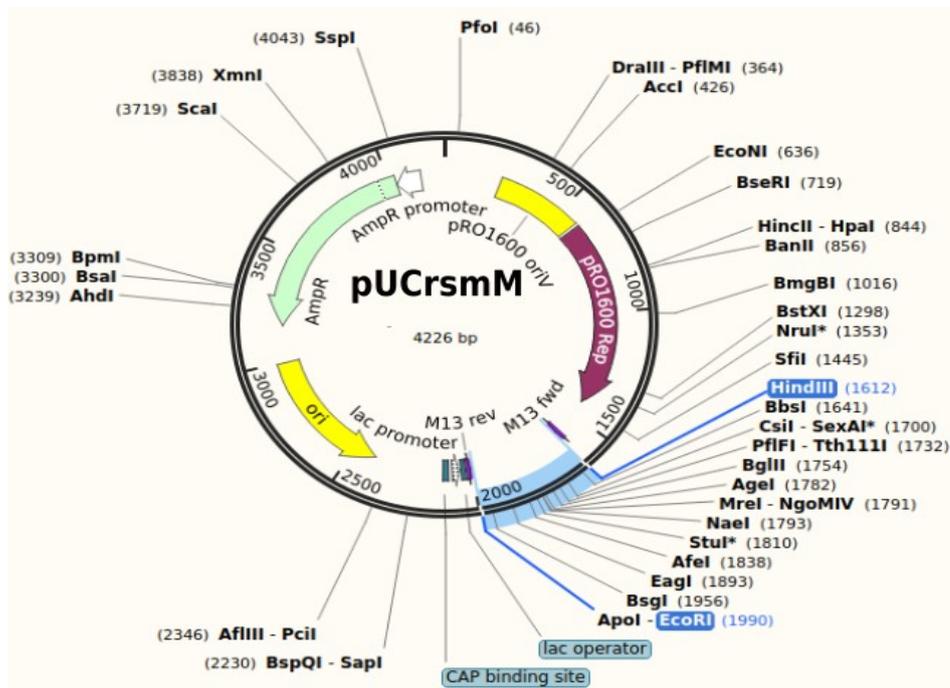


Figura 3: Mapa del plásmido para la sobreexpresión de *rsmM* utilizando el vector pUCP20.

5.4 Construcción de los plásmidos para la generación de las mutantes.

Para generar los vectores recombinantes se procedió a amplificar las secuencias que flanquean a los genes *rsmA*, *rsmM* y *rsmN* en los extremos 5' (río arriba) y 3' (río abajo) a 500 pb mediante PCR, con la enzima de alta fidelidad. Posteriormente se amplificaron por PCR los casetes de resistencia a tetraciclina (Tc^R) y apramicina (Apra^R) a partir de los vectores mini-CTX-lux y pIJ773, respectivamente, usando los oligonucleótidos FwTc/RvTc y

ApraFw/ApraRv, respectivamente. Estos fragmentos se purificaron de acuerdo al protocolo estándar del laboratorio. Se realizó la PCR de 3 piezas en el termociclador BIO-RAD T100 Thermal cycler usando la enzima Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase, a partir de los fragmentos 5'-rsmA y 3'-rsmA con el casete TcR, los extremos 5'-rsmM y 3'-rsmM con el casete ApraR y finalmente los extremos 5'-rsmN, 3'-rsmN con el casete de ApraR, obteniendo rsmA::Tc, rsmM::Apra y rsmN::Apra. Una vez obtenidos los casetes ligados a los extremos se cortaron con la enzima HindIII y se purificaron. Posteriormente, se realizó la restricción del plásmido pEX18Sm con la enzima HindIII de acuerdo al protocolo estándar del laboratorio, y posteriormente se ligó en este plásmido los fragmentos de la PCR de tres piezas empleando la enzima ligasa T4, obteniendo así los plásmidos pEX18SmrsmA::Tc, pEX18SmrsmM::Apra y pEX18SmrsmN::Apra. Estas ligaciones se usaron para transformar a la cepa de *E. coli* DH5 α por choque de calor, de acuerdo al protocolo del laboratorio (Alexandrine Froger & James E Hall, 2007). Las cepas transformada con el plásmido pEXrsmA::Tc se sembraron en medio LB adicionado con tetraciclina (Tc) 15 μ g/mL, y las transformadas con pEXrsmM::Apra y pEXrsmN::Apra en medio LB adicionado apramicina (Apra) 50 μ g/mL.

5.5 Obtención de las cepas de *P. aeruginosa*.

Para la cepa INP-43 se usaron los plásmidos del vector pME6032 (pMErsmA, pMErsmM, pMErsmN y vector vacío pME6032). Para las cepas ID4365 y PAO1 mutantes en *rsmA* (IDRsmA y PAO1rsmA), se usaron los plásmidos del vector pUCP20 (pUCrsmA, pUCrsmM y vector vacío pUCP20), la transformación se realizó por electroporación, de acuerdo al protocolo del laboratorio como a continuación se describe:

Se tomó 1 mL de medio de cultivo de toda la noche y se centrifugó, se realizaron 2 lavados con 800 μ L de sacarosa al 10%, y se resuspendió en 600 μ L de sacarosa al 10%. Después se tomaron 100 μ L y se pasaron a un tubo *Eppendorf*, se agregó el plásmido 200-500 ng, y se transfirió la mezcla a celdas de electroporación-BIO-RAD®. Posteriormente, se electroporó a 1.8 volts usando el equipo BIO-RAD® *Gene Pulser Electroporation system*. Se agregó 1 mL de medio LB y se incubó 1 hora. Por último, se platearon 100 μ L de la

transformación en placas de medio LB suplementadas con antibiótico de selección. Se seleccionaron algunas colonias y se resembraron en las placas con el antibiótico correspondiente.

Finalmente se procedió a confirmar la presencia de los plásmidos a través de extracción del plásmido y patrón de restricción. Para el caso de los plásmidos derivados del vector pME6032 se comprobó utilizando las enzimas EcoRI y XhoI, en el caso de los plásmidos derivados del pUCP20 se utilizaron las enzimas EcoRI y HindIII.

Para la cepa ID4365 transformada con el plásmido pUCrsmA se determinó la presencia del plásmido mediante PCR y posteriormente electroforesis.

5.6 Cuantificación de piocianina.

Se realizaron pre-cultivos de la cepa de interés en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente, se dejaron incubar toda la noche a 37°C. Se ajustó la densidad óptica del inóculo a una absorbancia de 0.05, posteriormente se incubaron las cepas en medio LB líquido a 37°C por 24 horas y la extracción de piocianina se realizó como se describe a continuación:

Se centrifugó todo el cultivo de cada una de las cepas a 10,000 rpm por 10 minutos. Se tomaron 5 mL del sobrenadante en un tubo de 50 mL, y luego se agregaron 3 mL de cloroformo, se agitaron en el vortex y posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm, después se tomó la fase inferior y se transfirió a tubos de ensayo de 5 mL y se agregó 1 mL de HCl, y se agitó. Finalmente se determinó la absorbancia por espectrofotometría UV a 520 nm y se calculó la cantidad de piocianina en $\mu\text{g ml}^{-1}/\text{DO}$ (Densidad Óptica).

5.7 Cuantificación de elastasa.

Se hizo un pre-inóculo de las cepas de interés en medio LB líquido y se dejó crecer toda la noche a 37° C y 225 rpm. Se inoculó el medio LB con la cantidad de pre-inóculo apropiado para alcanzar una D.O.600 inicial de 0.05, el cultivo se puso en una incubadora con agitación constante a 37°C por 16 h. Se

determinó la D.O. del cultivo obtenido y luego se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4° C y se colocó el sobrenadante en un tubo de reacción.

Se hicieron 3 réplicas de cada muestra. Para la cuantificación se agregaron 5 mg de elastina rojo-congo en el tubo de reacción y se adicionaron 0.85 mL de amortiguador de fosfatos de sodio 10 mM pH 7.5 y se adicionaron 150 µL de la muestra problema, a su vez se hizo la mezcla del control negativo, agregando en un tubo 0.85 mL del amortiguador + 0.15 mL de LB.

Los tubos se incubaron a 37° C con agitación constante durante 30 minutos en el caso de la cepa PAO1 y los correspondientes a la cepa ID4365 durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm y se colocó el sobrenadante de los tubos de reacción en tubos limpios, finalmente se realizaron las lecturas por espectrofotometría UV a 495 nm, usando como blanco el control negativo.

5.8 Cromatografía en capa fina (TLC) de ramnolípidos.

Se realizó un pre-inóculo de la cepa de interés en medio LB líquido y se dejó crecer en agitación por 16 h a 37° C a 225 rpm. A partir de este pre-cultivo se inoculó en medio LB líquido con la cantidad apropiada para alcanzar una D.O. a 600 nm inicial de 0.05, se dejó crecer a 37°C por 24 h a 225 rpm. Se centrifugó el cultivo a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y se colectó el sobrenadante en un tubo limpio. Se ajustó el sobrenadante a pH 2 con HCl concentrado, después se colocaron 5 mL del sobrenadante en un tubo de 15 mL (polipropileno) y se adicionaron 5 mL de la mezcla cloroformo-metanol (2:1) y luego se agitó vigorosamente por 15 minutos. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C y con la ayuda de una pipeta de vidrio se transfirió la fase orgánica (inferior) a un tubo nuevo y se dejó en la campana para evaporar el solvente. Se repitió la extracción y se puso la fase orgánica en el tubo que contiene la primera extracción y se dejó evaporar hasta quedar 1 o 1.5 mL, los cuales se pasaron a un tubo de 1.5 mL y se dejó evaporar el solvente completamente en una campana de extracción. Finalmente, el extracto obtenido se resuspendió en 100 µL de metanol.

Se usó la placa TLC SILICA GEL 60 F254 (MERK catalogo 1.05554.0001). Se corrieron las 18 muestras correspondientes a cada cepa en la placa de sílica, la placa se colocó en la cámara usando como eluyente cloroformo:metanol:ácido acético 65:15:2.

Por último, se reveló la placa usando α -naftol y colocándola a 80°C hasta la aparición de bandas color rojo que corresponden a los ramnolípidos.

6 Resultados.

6.1 Búsqueda de los homólogos del sistema Rsm y descubrimiento de RsmM.

Como se mencionó, la cepa INP-43 de *P. aeruginosa* es un aislado clínico y cuya regulación de los factores de virulencia por el sistema Rsm no ha sido investigado. Por lo tanto, para comenzar su estudio se llevó a cabo la búsqueda de los genes homólogos del sistema Rsm (*rsmA*, *rsmN*, *rsmV*, *rsmW*, *rsmY*, *rsmZ*) utilizando como referencia los genes de la cepa PAO1. De acuerdo al análisis bioinformático con BLAST, se encontraron los homólogos de estos genes en la cepa INP-43. Se determinó que tanto RsmA y RsmN de la cepa INP-43 son idénticos a RsmA y RsmN de la cepa PAO1 en sus estructuras de aminoácidos. A nivel de secuencia nucleotídica, *rsmA* alinea de manera global en un 100%, mientras que *rsmN* alinea en un 98.2%. Además, se encontró un gen que en 100 pb alinea con *rsmA* en un 75% y en una región de 60 aminoácidos con 75% de identidad (tabla 4 y figura 4).

Gen	% Identidad secuencia de DNA	% Identidad secuencia de aminoácidos
<i>rsmA</i>	100%	100%
<i>rsmN</i>	98.2%	100%
<i>rsmM</i>	31% (global) 75% (local)	75.24% (local)

Tabla 4: Resultados del alineamiento de secuencias de DNA y de aminoácidos con respecto a las secuencias de referencia de la cepa PAO1.

Valverde (2020). Por lo tanto, la cepa INP-43 contiene en su genoma tres proteínas reguladoras del sistema Rsm.

Es importante mencionar que se realizó la búsqueda de esta proteína en la cepa PAO1 en dónde no se encontró y en la cepa ID4365 en dónde se encontró una proteína que presenta un 77.931% con RsmM de la cepa INP-43.



Figura 5: alineamiento global de secuencias de aminoácidos, de la secuencia problema “carbon_storage” con RsmM de *P. aeruginosa* HEXT1 “RsmM_P.aeruginosa”.

De acuerdo con las estructuras propuestas por Sobrero & Valverde (2020) RsmA y RsmM comparten las estructuras β 1,2,3,4 así como una hélice α 1. Sin embargo, RsmM presenta una α -hélice adicional α 2, y 2 dominios de hoja β , β 5 y 6. Además presenta el residuo R44, el cual es necesario para la unión a RNA (Sobrero y Valverde 2020) (figura 6).



Figura 6: a) sombreado en roja se muestra el dominio que caracteriza a las proteínas homólogas de RsmA y sombreado en amarillo se encuentra el residuo de arginina 44 necesario

para unión a RNA. b) Comparación de la estructura de RsmA con RsmM (Sobrero & Valverde 2020).

Con respecto a los RNAs pequeños, se usaron como referencia los genes *rsmV*, *rsmW*, *rsmY*, *rsmZ* y se buscaron en la cepa INP-43, se encontró que los cuatro RNAs pequeños se encuentran en la cepa INP-43 con un 100% de identidad con respecto a la cepa PAO1.

6.2 Determinación de la función de RsmM en las cepas PAO1 e ID4365 de *P. aeruginosa*.

Debido a que la función de RsmM no ha sido caracterizada y con la finalidad de determinar si es un homólogo funcional de RsmA, se construyó el plásmido pUCrsmM con el fin de sobreexpresar dicho gen en las mutante en *rsmA* de las cepas PAO1 e ID4365 previamente construidas y posteriormente evaluar si esta sobreexpresión restaura el fenotipo en dichas mutantes.

6.2.1 Construcción del plásmido pUCrsmM.

A partir de la restricción del vector pUCP20 (figura 7) cortado con las enzimas de restricción HindIII y EcoR1, se insertó el gen *rsmM*. La reacción de ligación se usó para transformar a la cepa *E. coli* DH5 α , y las células obtenidas se sembraron en medio LB suplementado con Cb200. Posteriormente, las candidatas obtenidas se sembraron en medio LB líquido+Cb200 a 37°C, y luego se extrajo el DNA.

La confirmación de la obtención del plásmido pUCrsmM (figura 6) se realizó por restricción con las enzimas HindIII/EcoR1 el cual libera el inserto del vector. En la figura 6, en los carriles 2 y 4 se observa la presencia del gen *rsmM* de 669 pb y el vector pUCP20, confirmado la construcción del plásmido de manera correcta.

(1) (2) PM (3) (4)

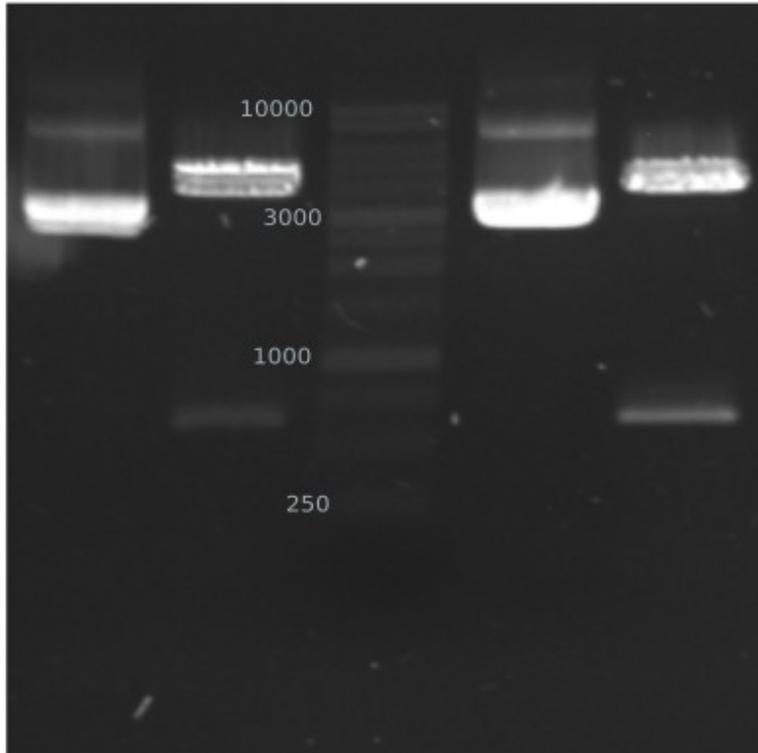


Figura 7: Restricción de los plásmidos construidos utilizando el vector Pucp20: en los carriles (2) y (4) se muestran las bandas correspondientes a *rsmM* de 669 pb. PM: Marcador de peso molecular.

6.2.2 Obtención de las cepas mutantes en *rsmA* de la cepa PAO1 e ID4365 que sobreexpresan a *rsmM*.

Para evaluar los efectos de la sobreexpresión de *rsmM* y compararlos con la sobreexpresión de *rsmA*, se procedió a transformar por electroporación las mutantes en *rsmA* de las cepas ID4365 y PAO1 (ID*rsmA* y PAO1*rsmA*) con los plásmidos pUC*rsmM* (figura 8). Adicionalmente se transformó la cepa PAO1*rsmA* con el plásmido pUC*rsmA* (figura 8).

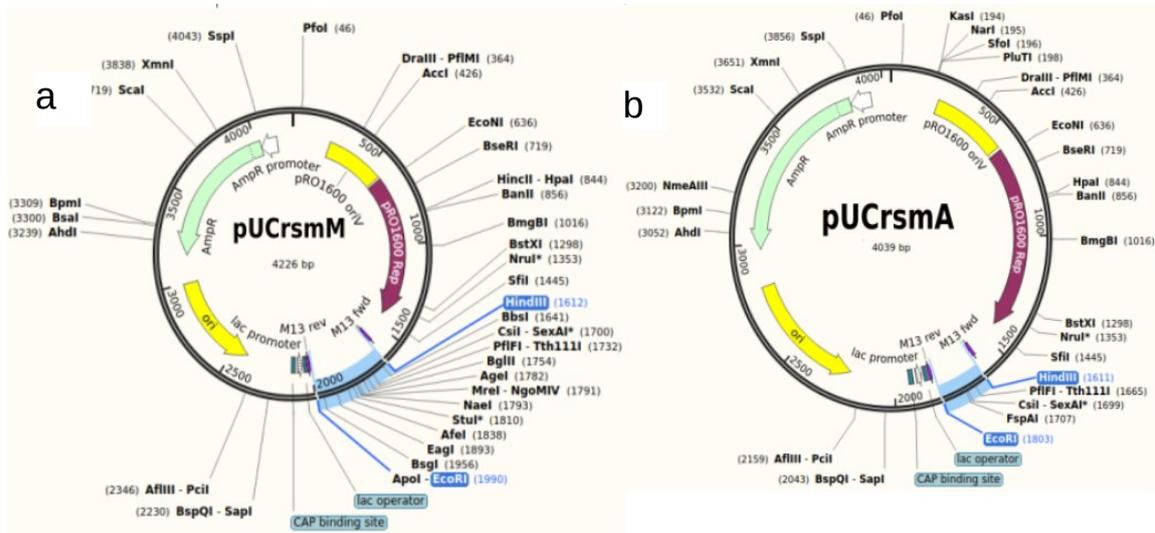


Figura 8: Construcción de los plásmidos *in silico*. a) plásmido pUCrsmA, la región sombreada de color azul se muestra el gen *rsmA* b) pUCrsmM, la región sombreada en azul corresponde al gen *rsmM*.

La confirmación de la presencia de los plásmidos pUCrsmM en las cepas candidatas se realizó extrayendo el plásmido a partir de un cultivo líquido y posteriormente se llevó a cabo una restricción con las enzimas EcoR1 y HindIII, liberando el fragmento correspondiente al plásmido pUCP20 de 2923 pb y el fragmento correspondiente a *rsmM* 669 pb. En la figura 9 se muestra la electroforesis de las candidatas, en la que se observa en los carriles 4 y 6 que corresponden a la cepa PAO1rsmA la presencia del gen *rsmM* de 669 pb y en el carril 8 que corresponde a la cepa IDrsmA y también se observa la banda de 669 pb de *rsmM*, a partir de estos resultados se confirmó que se obtuvieron las cepas transformadas IDrsmA/pUCrsmM y PAO1rsmA/pUCrsmM.

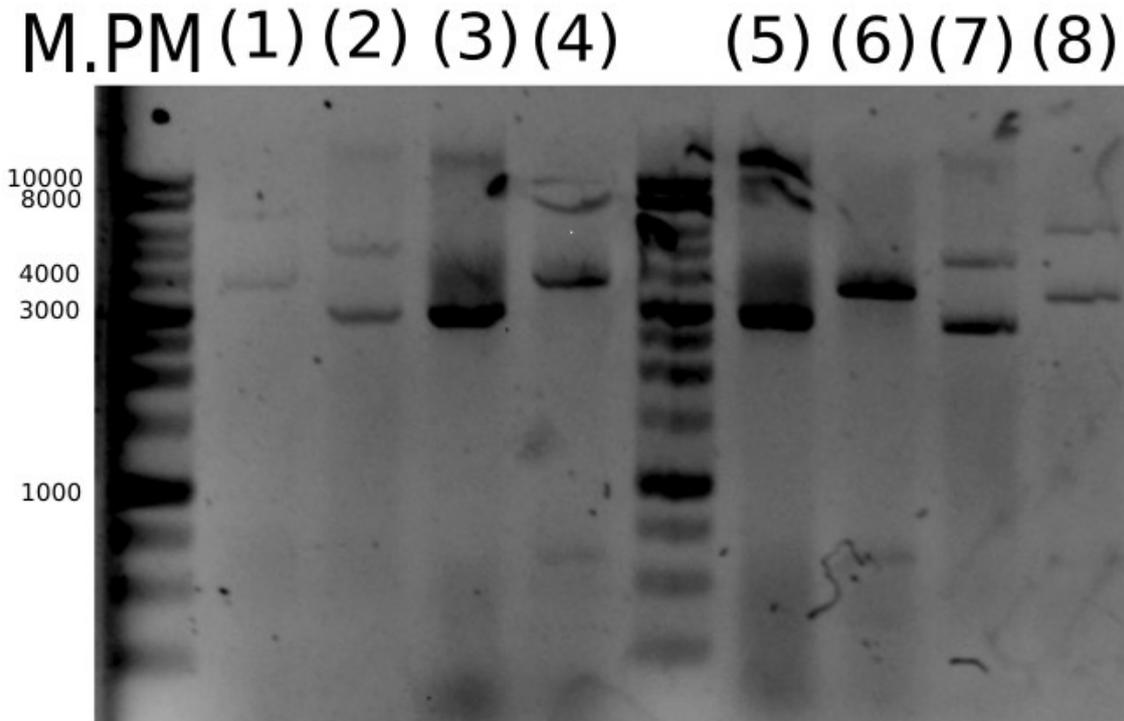


Figura 9: Restricción del DNA del plásmido extraído de las candidatas de PAO1rsmA e IDrsmA transformados con el plásmido pUCrsmM. P.M. corresponde al carril del marcador de peso molecular en pb. (1) corresponde al carril de la restricción de IDrsmA/pUCrsmM, no se obtuvo la banda correspondiente al gen *rsmM*. (2) corresponde al control de restricción en el que se observa la banda que corresponde al plásmido pUCrsmM. (3) corresponde al carril del control de restricción de la cepa PAO1rsmA/pUCrsmM. (4) corresponde al carril de la restricción de PAO1rsmA/pUCrsmM en el que se puede observar la banda de *rsmM* de 669 pb. (5) carril correspondiente al control de restricción PAO1rsmA/pUCrsmM se observa la banda de pUCrsmM. (6) carril de la restricción de PAO1rsmA/pUCrsmM se observa la banda de 669 pb correspondiente a *rsmM*. (7) Carril correspondiente al control de restricción IIDrsmA/pUCrsmM se observa la banda pUCrsmM. (8) corresponde al carril de la restricción de IDrsmA/pUCrsmM se puede observar la banda correspondiente a *rsmM* de 669 pb.

Por último se confirmó la transformación de PAO1rsmA con el plásmido pUCrsmA por PCR, en la figura 10 se muestra la electroforesis de los amplificadores, en la que se encuentra la banda de 504 pb que corresponde al gen *rsmA*, resultado con el que se confirmó que se obtuvo la cepa PAO1rsmA/pUCrsmA.

PM (1) (2) (3) (4) (5)

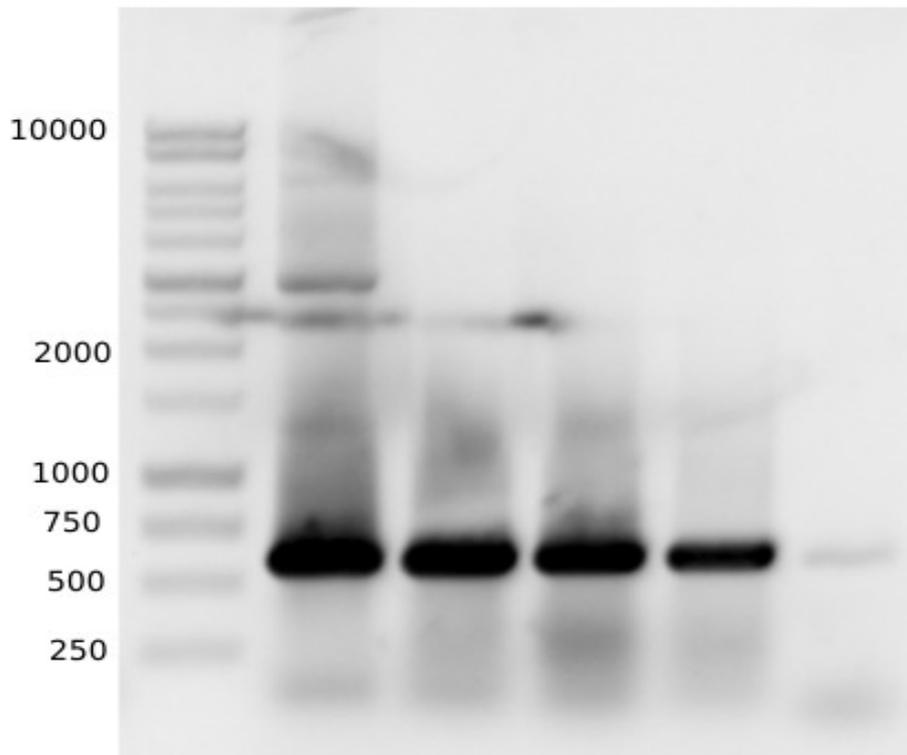


Figura 10: Electroforesis de la PCR, se usó el DNA templado de diferentes colonias de PAO1*rsmA*/pUC*rsmA*. P.M. corresponde al marcador de peso molecular en Kb. (1) corresponde al control positivo del fragmento de *rsmA* de 504 pb. (2) corresponde al carril de la colonia 2 en la que se observa el fragmento de *rsmA* de 504 pb. (3) corresponde al carril de la colonia 7 en el que se observa el fragmento de *rsmA* de 504 pb. (4) corresponde al duplicado de la colonia 7 en el que se observa nuevamente el fragmento de *rsmA*. (5) control negativo de PCR.

6.2.3. Efecto de la sobreexpresión *rsmM* en la producción de piocianina en la cepa ID*rsmA*.

Con el fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión de *rsmM* en la producción de piocianina se cultivaron la cepa silvestre, la cepa mutante en *rsmA* (ID*rsmA*), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa *rsmM* (ID*rsmA*/pUC*rsmM*) y control de plásmido pUCP20 (ID*rsmA*/PUCP20) en medio LB líquido a 37°C por 24 horas y posteriormente se realizó la extracción de piocianina, se determinó por espectrofotometría a 520 nm.

Como se puede observar en la figura 11, la cepa que sobreexpresa *rsmM* (ID*rsmA*/pUC*rsmM*), produce una cantidad de piocianina significativamente menor comparada con la mutante en *rsmA* (ID*rsmA*) y el control de plásmido (ID*rsmA*/PUCP20), siendo la producción de piocianina en ID*rsmA*/pUC*rsmM*

menos de la tercera parte de lo que produce la cepa IDrsmA, llevando la producción de piocianina a niveles similares a la cepa silvestre.

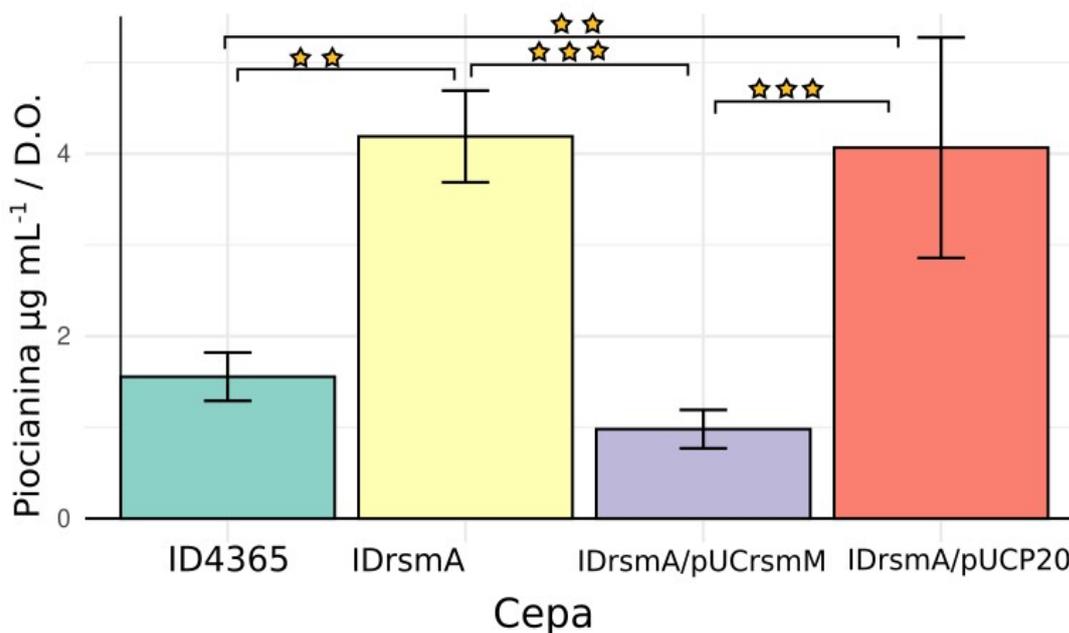


Figura 11. Gráfica de barras de la cuantificación de piocianina de la cepa ID4365, en el eje X corresponde a las cepas usadas en la cuantificación: la cepa silvestre ID4365, la cepa mutante en *rsmA* (IDrsmA), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa *rsmM* (IDrsmA/pUCrsmM) y control de plásmido pUCP20 (IDrsmA/pUCP20), mientras que en el eje Y corresponde a la piocianina producida en ($\mu\text{g mL}^{-1}$ / D.O.). Las barras de error indican la desviación estándar, las estrellas corresponden al nivel de significancia estadística de acuerdo a la prueba *t* de student, $*=0.05>p>0.01$, $**=0.01>p>0.001$ y $***=p<0.001$. Se observa la disminución de la producción de piocianina como efecto de la sobreexpresión de *rsmM*.

6.2.4 Efecto de la sobreexpresión de *rsmM* en la producción de piocianina en la cepa PAOrsmA.

Con el fin de evaluar los efectos de la sobreexpresión de *rsmM* en la producción de piocianina en la cepa PAO1 mutante en *rsmA*, se cultivó la cepa PAO1 silvestre, la cepa mutante en *rsmA* (PAO1rsmA), la mutante que sobreexpresa *rsmM* (PAO1rsmA/pUCrsmM) y el control de transformación (PAO1rsmA/pUCP20), en medio LB líquido a 37°C por 24 horas y posteriormente se realizó la extracción de piocianina, se determinó por espectrofotometría a 520 nm.

En la cuantificación de piocianina en la cepa PAO1 (figura 12), la cepa mutante en *rsmA* que sobreexpresa a *rsmM* (PAO1rsmA/pUCrsmM), presenta una cantidad significativamente menor de piocianina, comparada con la cepa PAO1 mutante en *rsmA* (PAO1rsmA) y el control de plásmido (PAO1rsmA/pUCP20), lo cual nos indica que la sobreexpresión de *rsmM* tiene como efecto la

disminución en la producción de piocianina, a niveles similares a la cepa silvestre en la mutante en *rsmA*. Por otro lado, solo PAO1*rsmA*/pUCP20 presenta una producción de piocianina significativamente menor que PAO1, sin embargo no se encontraron diferencias en la producción de piocianina entre las cepas PAO1*rsmA* y PAO1*rsmA*/pUCP20 por lo que ambas mutantes producen niveles de piocianina similares.

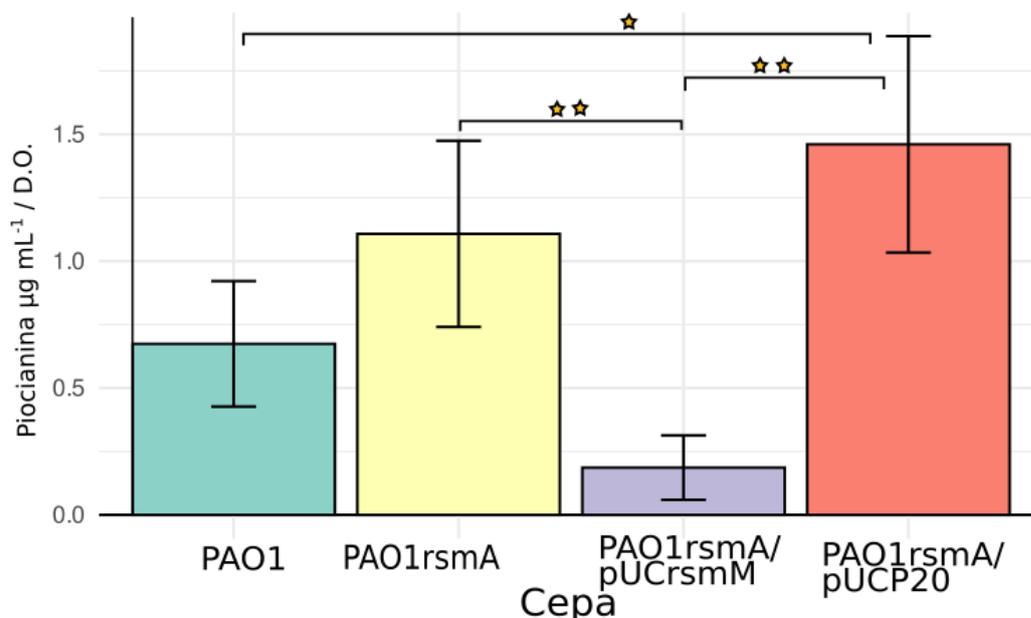


Figura 12. Gráfica de barras de la cuantificación de piocianina de PAO1, en el eje X corresponde a las cepas usadas en la cuantificación: la cepa silvestre PAO1, la cepa mutante en *rsmA* (PAO1*rsmA*), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa a *rsmM* (PAO1*rsmA*/pUCrsmM) y control de plásmido pUCP20 (PAO1*rsmA*/pUCP20), mientras que en el eje Y corresponde a la piocianina producida en ($\mu\text{g mL}^{-1}$ / D.O.) . Las barras de error indican la desviación estándar, las estrellas corresponden al nivel de significancia estadística de acuerdo a la prueba *t* de student, $*=0.05>p>0.01$, $**=0.01>p>0.001$ y $***=p<0.001$. Se observa la disminución de la producción de piocianina como efecto de la sobreexpresión de *rsmM*.

6.2.5 Efecto de la sobreexpresión *rsmM* en la producción de elastasa en la cepa ID*rsmA*.

La inactivación de *rsmA* en la cepa silvestre ID4365 tiene como efecto una menor producción de elastasa, por lo tanto, con la finalidad de determinar si RsmM es capaz de restaurar dicho fenotipo, medimos la producción de elastasa cultivando la cepa silvestre, la cepa mutante en *rsmA* (ID*rsmA*), la cepa mutante en *rsmA* transformada que sobreexpresa a *rsmA* (ID*rsmA*/pUCrsmA), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa a *rsmM* (ID*rsmA*/pUCrsmM) y control de plásmido pUCP20 (ID*rsmA*/pUCP20), durante 16 horas a 37°C en medio LB líquido. Posteriormente se realizó el ensayo de

elastasa con el reactivo elastina rojo congo, se determinó la absorbancia por espectrofotometría UV a 495 nm, este ensayo se realizó por triplicado.

Los resultados mostraron que la cepa IDrsmA/pUCrsmM presenta una producción significativamente mayor de elastasa de aproximadamente 4 veces más al comparar con la cepa silvestre (ID4365), la mutante en *rsmA* (IDrsmA) y la mutante en *rsmA* transformada con el plásmido vacío (IDrsmA/pUCP20), y una producción de elastasa significativamente mayor, de casi el doble comparada con la cepa que sobreexpresa a *rsmA* (IDrsmA/pUCrsmA) (figura 13). Así, se observa un efecto de la sobreexpresión de *rsmM* en la producción de elastasa en la cepa ID4365, el cual es un aumento en su producción incluso mayor que al sobreexpresar a *rsmA*. De manera similar, al sobreexpresar a *rsmA* (IDrsmA/pUCrsmA) se observa un aumento significativo en su producción cuando se compara con la cepa ID4365, y este aumento es aún mayor cuando se compara con las cepas IDrsmA e IDrsmA/pUCP20. Por último, al comparar entre las cepas ID4365, IDrsmA e IDrsmA/pUCP20 no se observan diferencias significativas en la producción de elastasa.

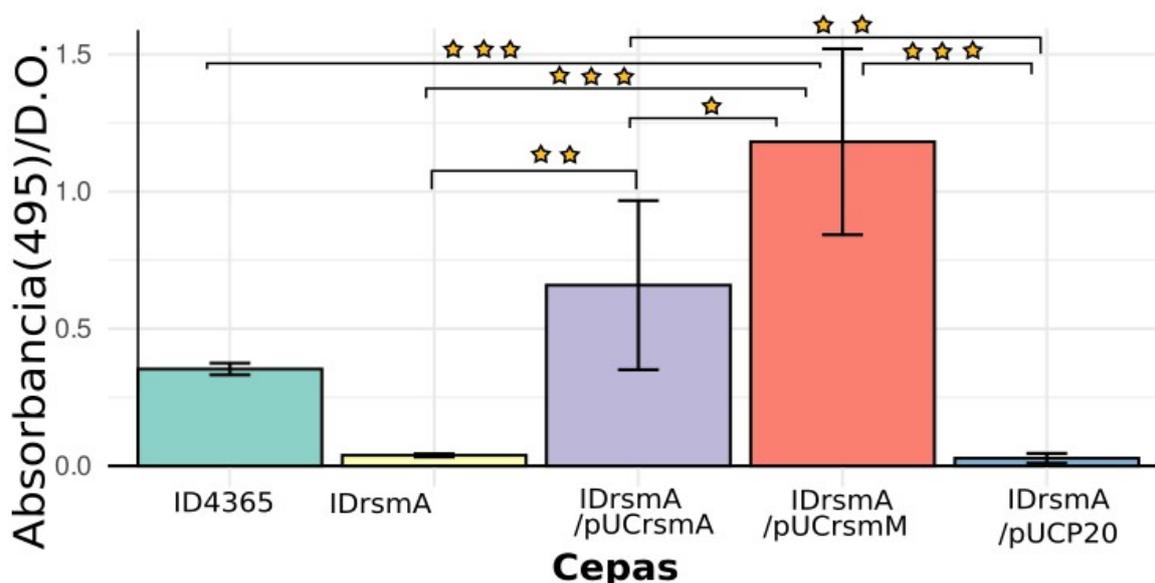


Figura 13. Gráfica de barras de la cuantificación de elastasa de la cepa ID4365, en el eje X corresponde a las cepas usadas en la cuantificación: la cepa silvestre ID4365, la cepa mutante en *rsmA* (IDrsmA), la cepa mutante en *rsmA* que sobreexpresa *rsmA* (IDrsmA/pUCrsmA), la cepa mutante en *rsmA* que sobreexpresa *rsmM* (IDrsmA/pUCrsmM) y el control de plásmido pUCP20 (IDrsmA/pUCP20), mientras que en el eje Y corresponde a la elastasa producida en absorbancia/D.O. Las barras de error indican la desviación estándar, las estrellas corresponden al nivel de significancia estadística de acuerdo a la prueba *t* de student, *=0.05>p>0.01, **=0.01>p>0.001 y ***=p<0.001. Se observa el aumento de la producción de elastasa como efecto de la sobreexpresión de *rsmM*.

6.2.6 Efecto de la sobreexpresión *rsmM* en la producción de elastasa en la cepa PAOrsmA.

Para determinar si había diferencias en la producción de elastasa al sobreexpresar a *rsmM* en la cepa PAO1 mutante en *rsmA*, se cultivaron la cepa silvestre PAO1, la cepa mutante en *rsmA* (PAO1rsmA), la cepa mutante en *rsmA* que sobreexpresa a *rsmA* (PAO1rsmA/pUCrsmA), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa a *rsmM* (PAO1rsmA/pUCrsmM) y el control de plásmido pUCP20 (PAO1rsmA/pUCP20), durante 16 horas a 37°C en medio LB líquido. Después se realizó el ensayo de elastasa con el reactivo elastina rojo congo, se determinó la absorbancia por espectrofotometría a 495 nm, este ensayo se realizó por triplicado.

En la cuantificación de elastasa para la cepa PAO1 (figura 14), se observó que en la cepa que sobreexpresa a *rsmM* (PAO1rsmA/pUCrsmM), se produce una cantidad de elastasa significativamente menor comparada con la cepa silvestre (PAO1), quien produce 10 veces más elastasa. Al comparar la cepa complementada con *rsmA* (PAO1rsmA/pUCrsmA) con la cepa que sobreexpresa a *rsmM* (PAO1rsmA/pUCrsmM, se observa que la producción de elastasa de la cepa que sobreexpresa *rsmM*, es significativamente menor, siendo menos de la cuarta parte. La cepa PAO1rsmA/pUCrsmM produce la menor cantidad de elastasa entre todas las cepas, produce de manera significativa menos de la cuarta parte de elastasa de lo que la cepa PAO1rsmA produce. Se observa una disminución en la producción de elastasa causado por la sobreexpresión de *rsmM*. Basado en los resultados anteriores, el efecto de la sobreexpresión de *rsmM* en la cepa PAO1 es la disminución en la producción de elastasa. Además, la delección de PAO1 mutante en *rsmA* no presenta una diferencia significativa en la producción de elastasa al comparar con la cepa PAO1, en este caso no se encontró un efecto de *rsmA* en la producción de elastasa en la cepa PAO1.

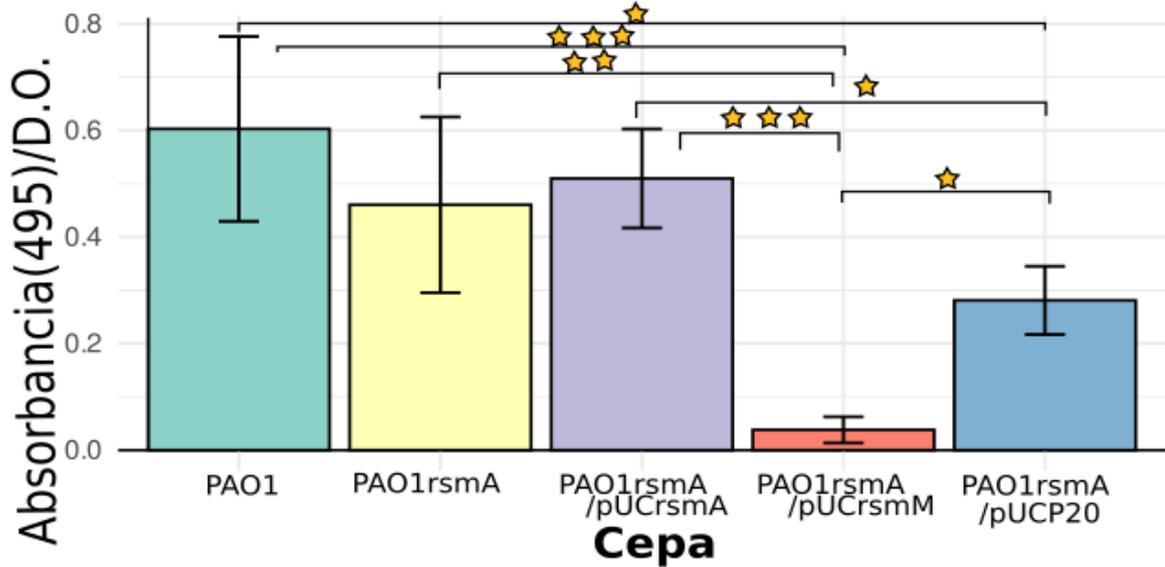


Figura 14. Gráfica de barras de la cuantificación de elastasa de la cepa PAO1, en el eje X corresponde a las cepas usadas en la cuantificación: la cepa silvestre PAO1, la cepa mutante en *rsmA* (PAO1rsmA), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa *rsmA* (PAO1rsmA/pUCrsmA), la mutante en *rsmA* que sobreexpresa a *rsmM* (PAO1rsmA/rpUCsmM) y control de plásmido pUCP20 (PAO1rsmA/PUCP20, mientras que en el eje Y corresponde a la elastasa producida en absorbancia/D.O. Las barras de error indican la desviación estándar, las estrellas corresponden al nivel de significancia estadística de acuerdo a la prueba *t* de student, *=0.05>p>0.01, **=0.01>p>0.001 y ***=p<0.001. Se observa la disminución de la producción de elastasa como efecto de la sobreexpresión de *rsmM*.

6.2.7 Efecto de la sobreexpresión de *rsmM* en la producción de ramnolípidos en las mutantes en *rsmA* de la cepa PAO1 e ID4365.

Con el fin de evaluar si la sobreexpresión de *rsmM* tiene un efecto en la producción de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos en las cepas PAO1 e ID4365 mutantes en *rsmA*, se cultivaron estas cepas, así como sus respectivas cepas silvestres, sus mutantes en *rsmA* que sobreexpresan a *rsmA*, mutantes en *rsmA* que sobreexpresan a *rsmM* y las cepas mutantes con el plásmido vacío como control, por 24 horas a 37°C en medio LB líquido, posteriormente se realizó la extracción de ramnolípidos, y se realizó la cromatografía en capa fina.

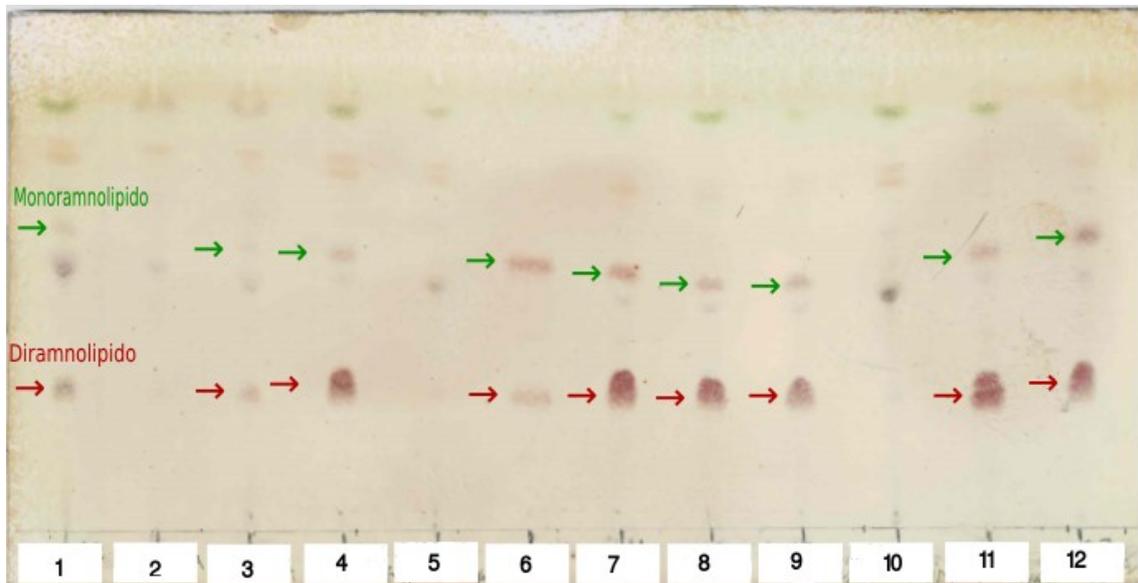


Figura 15: TLC de ramnolípidos. Las flechas verdes indican la presencia de mono-ramnolipidos, mientras que las flechas rojas indican la presencia de di-ramnolipidos. 1 ID4365. 2 IDrsmA. 3 IDrsmA/pUCrsmA. 4 IDrsmA/pUCrsmM. 5 IDrsmA/pUCP20. 6 CTRL. 7 PAO1. 8 PAO1rsmA. 9 PAO1rsmA/pUCrsmA. 10 PAO1rsmA/pUCrsmM. 11 PAO1rsmA/pUCP20. 12 PAO1rsmA/pUCrsmA7.

Como se muestra en la figura 15, se determinó que la cepa ID4365 produce mono y di ramnolípidos, mientras que la mutante en *rsmA* (IDrsmA) no produce ninguno de los dos. En la cepa que sobreexpresa a *rsmA* (IDrsmA/pUCrsmA) se restaura el fenotipo de producción similar a lo que ocurre en la cepa que sobreexpresa a *rsmM*. Por último, el plásmido vacío (IDrsmA/PUCP20) no causa ningún efecto y presenta el mismo fenotipo que la mutante en *rsmA*.

Con respecto a la cepa PAO1, la cepa silvestre produce ramnolípidos mientras que la mutación en *rsmA* no parece tener un efecto en su producción. Al sobreexpresar a *rsmA* en la mutante en *rsmA* la producción de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos no cambia, sin embargo, contrario a lo sucedido en la cepa ID4365 la sobreexpresión de *rsmM* en la mutante en *rsmA* de la cepa PAO abate la producción de ramnolípidos. Como es de esperarse, el plásmido vacío no tiene ningún efecto en la producción de estos compuestos.

6.3 Efecto de la sobreexpresión de *rsmA*, *rsmN* y *rsmM* en la cepa INP-43 sobre la producción de piocianina.

6.3.1 Construcción del plásmido pMErsmM.

Debido a que los plásmidos que permiten la sobreexpresión de *rsmA* y *rsmN* utilizando el vector pME6032 ya estaban contruidos, se procedió a construir únicamente el plásmido que sobreexpresa a *rsmM* (Tabla 2) mediante la restricción de este vector con las enzimas EcoR1 y Xho1 y posterior ligación del gen *rsmM*.

La reacción de ligación se usó para transformar a la cepa *E. coli* DH5 α , se seleccionaron clonas resistentes a tetraciclina y se confirmó la obtención del plásmido por patrón de restricción utilizando las enzimas EcoR1/Xho1, para separarlo por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La figura 16 corresponde a la electroforesis, en los carriles 2, 6 y 8 se observa la presencia de *rsmM*, confirmado la presencia del plásmido.

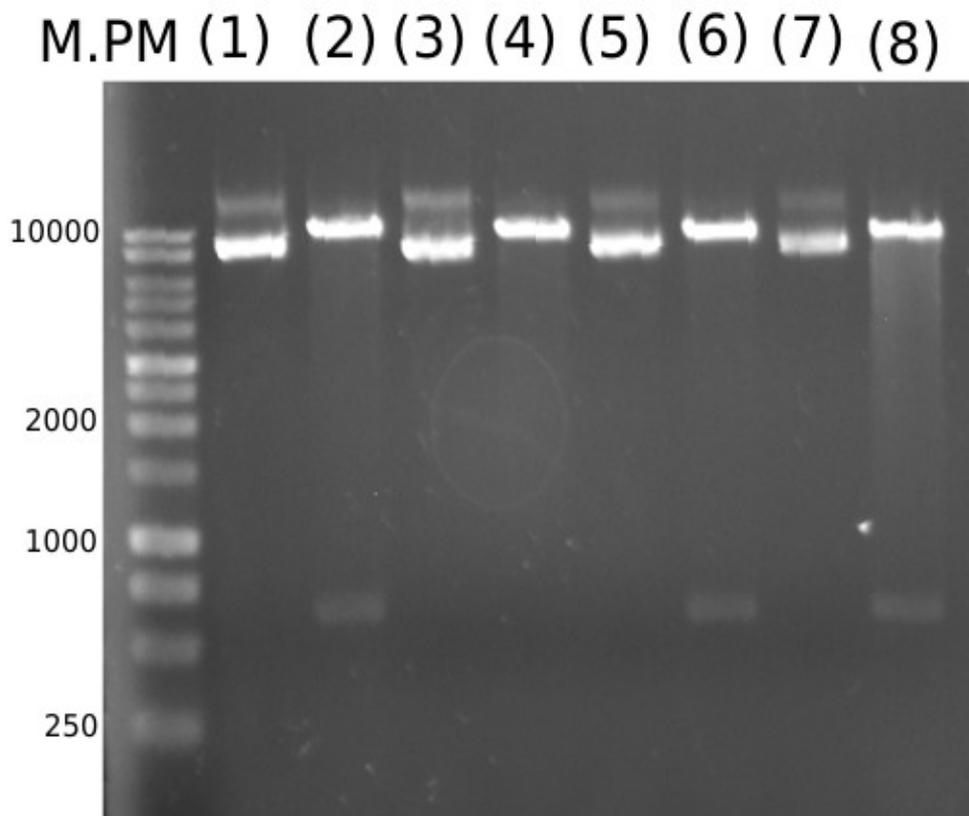


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la restricción del plásmido pMErsmM. El Carril "M.PM" corresponde al marcador de peso molecular en pb. Los carriles (1), (3), (5) y (7)

corresponden al plásmido pMErsmM sin digerir. Los carriles (2), (4), (6) y (8) corresponden a la restricción del plásmido pMErsmM, mientras que en los carriles (2), (6) y (8) se puede observar la banda del fragmento correspondiente al gen *rsmM*. de 669 pb

6.3.2 Obtención de las cepas que sobreexpresan a *rsmA*, *rsmN* y *rsmM* en *P. aeruginosa* INP-43.

Los plásmidos pMErsmA, pMErsmM y pMErsmN (figura 17) se usaron para transformar a la cepa INP-43 (Tabla 2). A las candidatas obtenidas se les extrajo el plásmido y se realizó la restricción con las enzimas EcoR1 y Xho1, se corrieron en gel de agarosa al 1% las restricciones y se confirmaron la presencia de los plásmidos como se muestra en la figura 18.

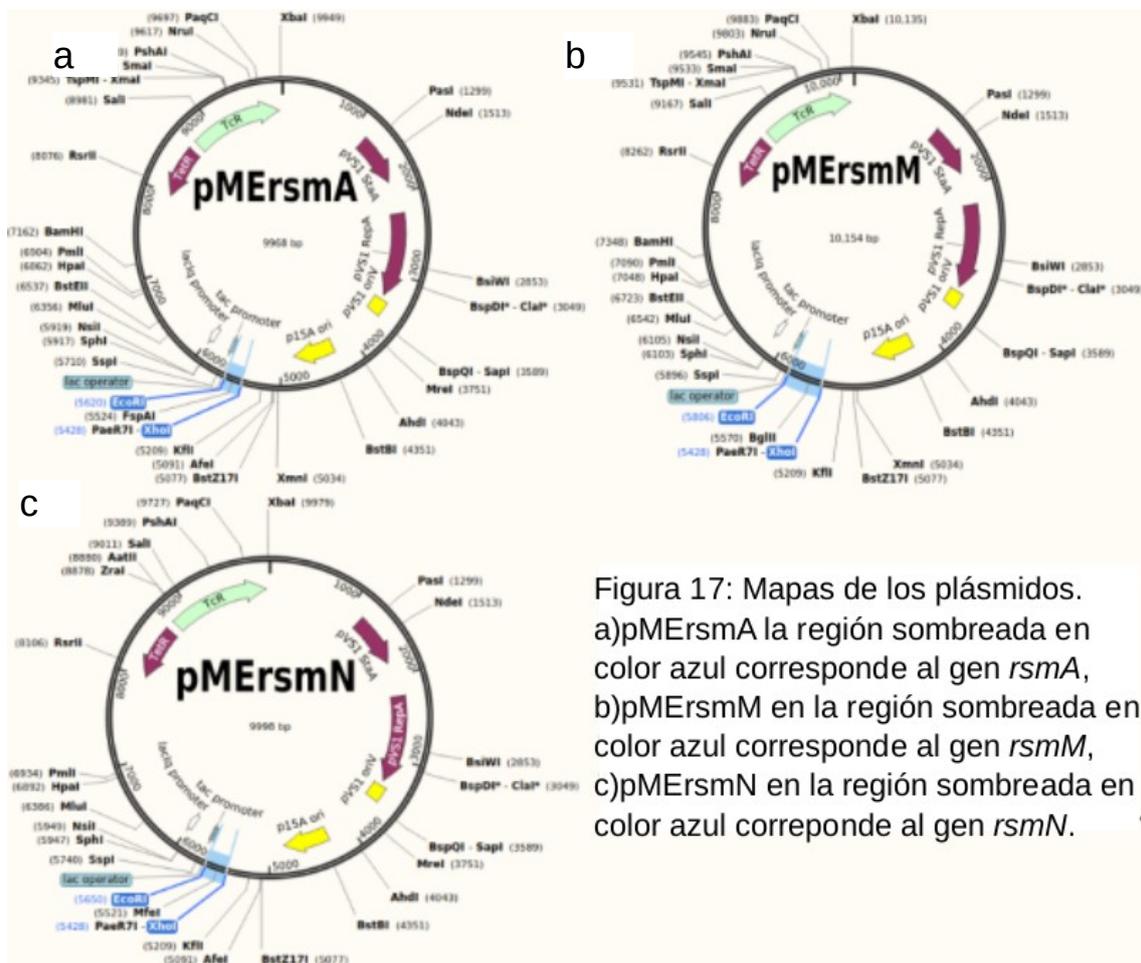


Figura 17: Mapas de los plásmidos. a)pMErsmA la región sombreada en color azul corresponde al gen *rsmA*, b)pMErsmM en la región sombreada en color azul corresponde al gen *rsmM*, c)pMErsmN en la región sombreada en color azul corresponde al gen *rsmN*.

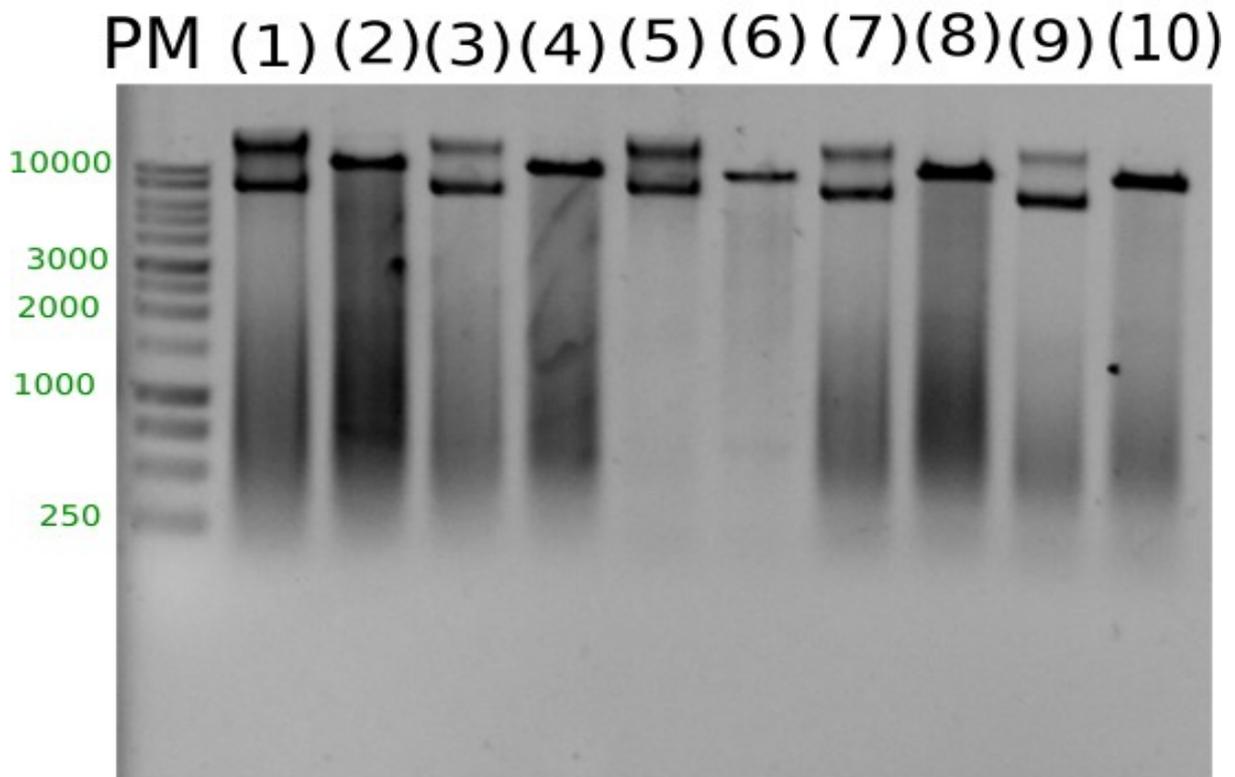


Figura 18. Confirmación de la transformación. a) Confirmación de la presencia de los plásmidos de interés en la cepa INP-43. PM es el marcador de peso molecular en pb. En el carril (1) se muestra el control que corresponde al plásmido pMErsmM sin digerir de 10496. En el carril (2) se muestra la restricción con las enzimas EcoR1/Xho1 y se observa la banda del fragmento que corresponde al gen *rsmM* de 669 pb. En el carril (3) se muestran las bandas correspondientes al plásmido pMErsmA de 10320 pb. En el carril (4) se muestra la restricción de pMErsmA, en el que se observa la banda del fragmento correspondiente a *rsmA* de 504 pb. El carril (5) corresponde al control pMErsmN sin digerir. El carril (6) corresponde a la restricción del plásmido pMErsmN, se observa la banda del fragmento correspondiente al gen *rsmN* de 611 pb.

6.3.3 Cuantificación de piocianina en la cepa INP-43 que sobreexpresa a *rsmA*, *rsmN* o *rsmM*.

Para determinar cómo afecta la sobreexpresión de *rsmA*, *rsmM* y *rsmN* en la producción de piocianina, se cultivó la cepa INP-43 con los plásmidos para sobreexpresar a *rsmA* (INP-43/pMErsmA), *rsmM* (INP-43/pMErsmM), *rsmN* (INP-43/pMErsmN) en el vector pME6032 y el control de plásmido (INP-43/pME6032), en medio LB líquido, al que se agregó IPTG como inductor para la transcripción, se incubó a 37°C por 24 horas y posteriormente se realizó la extracción de piocianina, se determinó por espectrofotometría a 520 nm.

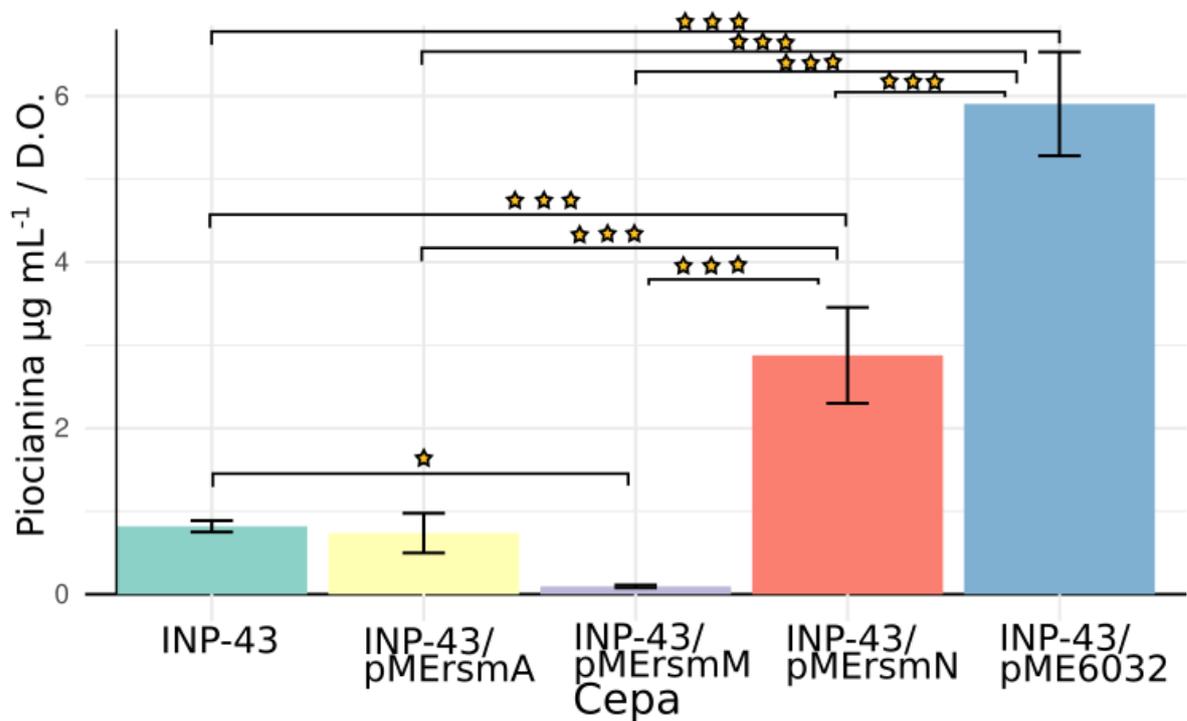


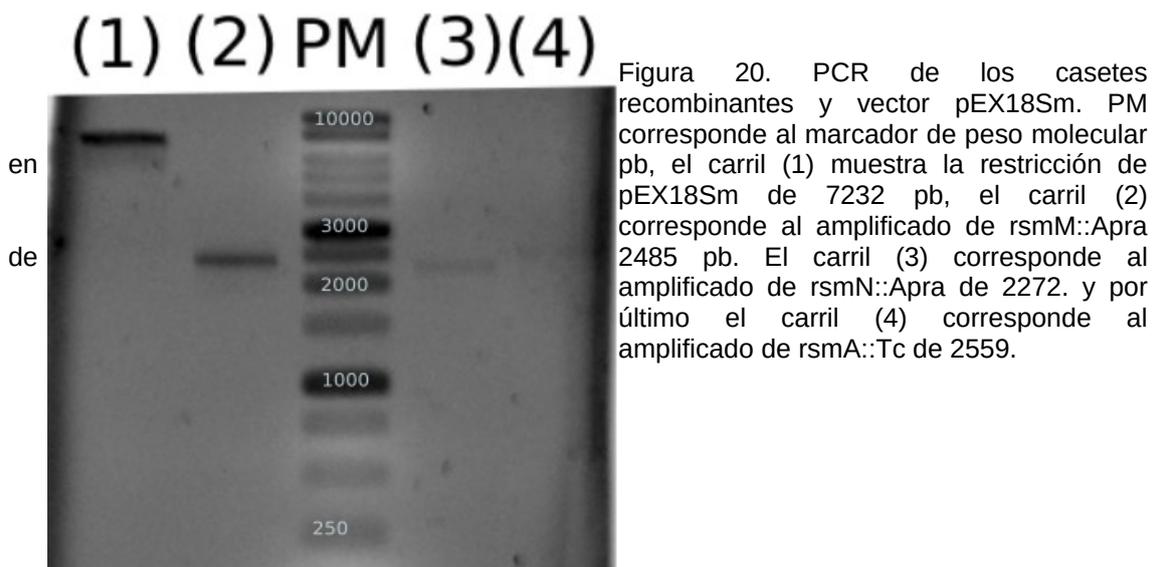
Figura 19. Gráfica de barras de la cuantificación de piocianina de INP-43, en el eje "X" corresponde a las cepas usadas en la cuantificación: la cepa silvestre INP-43, la cepa que sobreexpresa *rsmA* (INP-43/pMErsmA), la cepa que sobreexpresa *rsmM* (INP-43/pMErsmM), la cepa que sobreexpresa *rsmN* (INP-43/pMErsmN) y control de plásmido pME6032 (INP-43/pME6032), mientras que el eje "Y" corresponde a la piocianina producida en ($\mu\text{g mL}^{-1}$ / D.O.). Las barras de error indican la desviación estándar, las estrellas corresponden al nivel de significancia estadística de acuerdo a la prueba "t de student", *=0.05>p>0.01, **=0.01>p>0.001 y ***=p<0.001. Se observa la disminución de la producción de piocianina como efecto de la sobreexpresión de *rsmM*.

En la cuantificación de piocianina (figura 19), se encontró que el control del plásmido (INP-43/pME6032) presenta una cantidad significativamente mayor de piocianina comparada con la cepa silvestre (INP-43), demostrando que la presencia del plásmido tiene un efecto en la producción de piocianina. Por otro lado, a pesar del efecto provocado por el plásmido vacío, al expresar a *rsmA* (INP-43/pMErsmA) y *rsmM* (INP-43/pMErsmM), disminuyen la producción de manera significativa comparado con la cepa INP-43/pME6032, en un 80% y 95% respectivamente. Por otro lado, la cepa INP-43/pMErsmN a pesar de que produce niveles significativamente menores de piocianina comparados con la cepa INP-43/pME6032 produce prácticamente el doble de piocianina que la cepa silvestre. Además, es importante mencionar que al sobreexpresar a *rsmM* la producción de piocianina es significativamente menor comparada con la cepa silvestre, es aproximadamente 80% más baja. A pesar de que existe esta diferencia la interferencia del vector pME6032 en el análisis no permite confirmar que hay un efecto de RsmM que provoca la reducción en la producción de piocianina en la cepa INP-43. Por último, no se encontraron

diferencias significativas al comparar la cepa INP-43/pMErsmA con la cepa INP-43.

6.4 Construcción de los plásmidos para generar mutaciones en *rsmA*, *rsmN* y *rsmM* en *P. aeruginosa* INP-43.

Con el objetivo de construir plásmidos que permitan la generación de mutaciones por reemplazo de los genes en *rsmA*, *rsmN* y *rsmM*, se amplificaron 500 pb río arriba y río abajo de cada uno de los genes. Posteriormente se realizó un PCR de tres piezas utilizando los fragmentos 5', 3' y el casete de resistencia para tetraciclina en el caso de la mutación en *rsmA* y de apramicina para las mutantes en *rsmN* y *rsmM*. Los productos de la PCR de tres piezas (figura 20) fueron purificados y posteriormente digeridos con la enzima HindIII.



El plásmido pEX18Sm fue digerido con la enzima HindIII, y se ligaron los productos de PCR digeridos con la misma enzima. Las reacciones de ligación fueron usadas para transformar a la cepa DH5 α , se seleccionaron candidatas que crecieran en el antibiótico de selección y posteriormente se extrajo el plásmido de acuerdo al protocolo y se realizó la restricción con HindIII (figura 21).

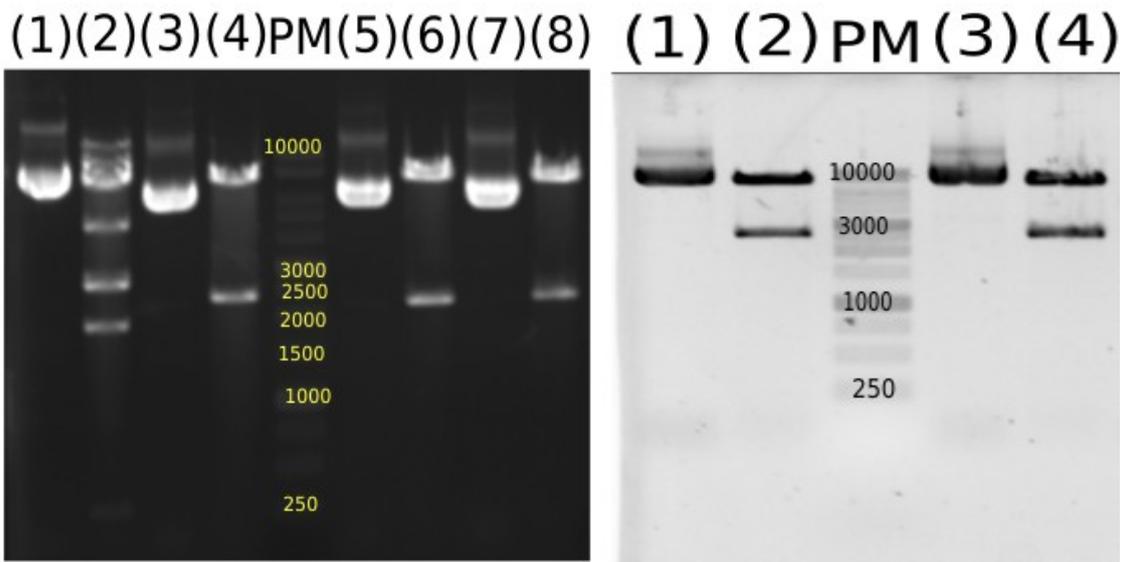
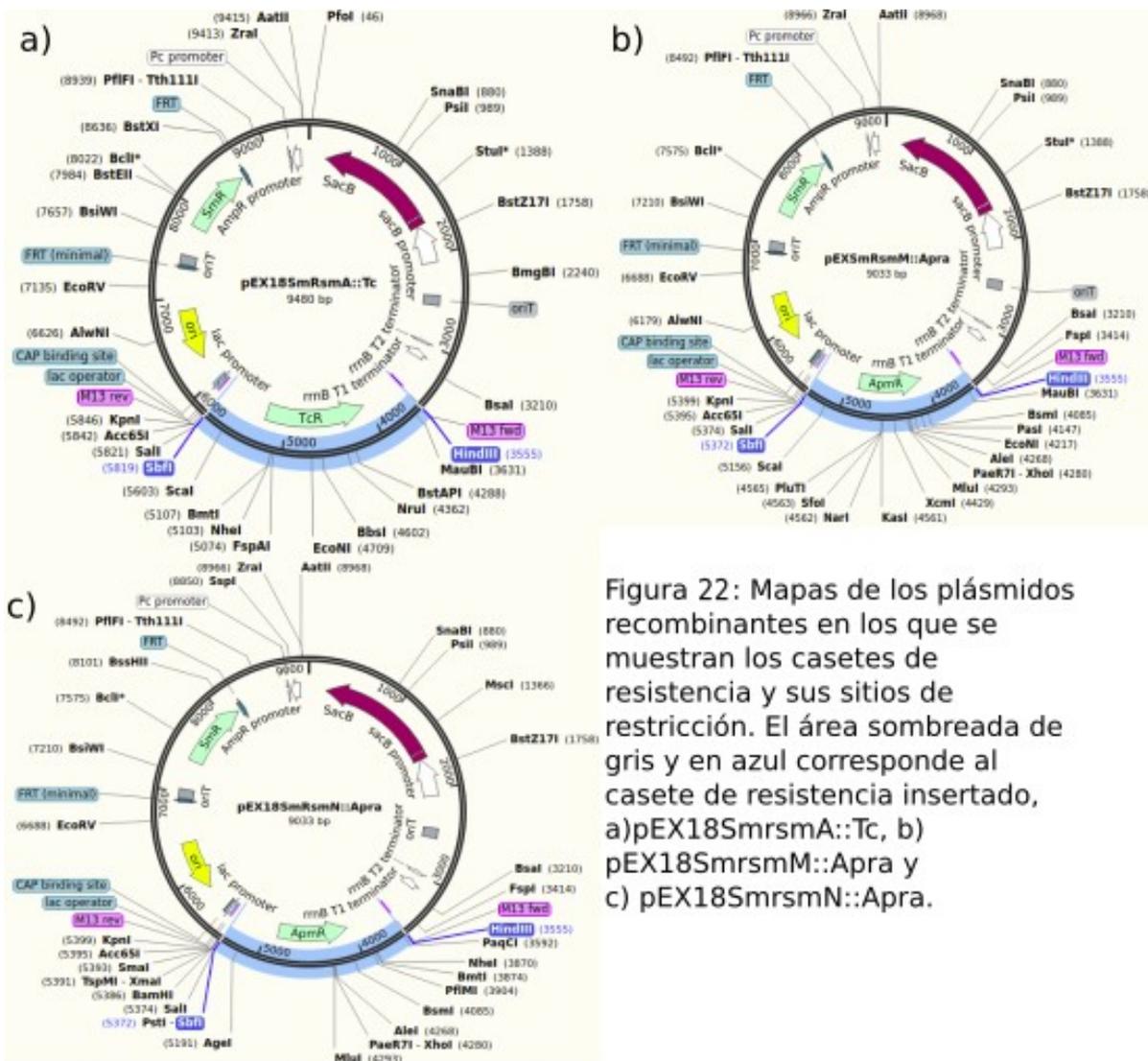


Figura 21: Restricción de los plásmidos recombinantes. a) PM corresponde al marcador de peso molecular. (4) se muestra la restricción del plásmido pEX18SmrsmM::Apra y se muestra la banda correspondiente al fragmento de rsmM::Apra de 2483 pb. En los carriles (6) y (8) se muestra la restricción del plásmido pEX18SmrsmN::Apra y se observa la presencia de la banda correspondiente al fragmento rsmN::Apra de 2272. b) PM corresponde al marcador de peso molecular, en los carriles (2) y (4) se muestra la restricción del plásmido pEX18SmrsmA::Tc, y se observa la banda correspondiente al fragmento de rsmA::Tc de 2559.

Por lo tanto, se construyeron de manera correcta los plásmidos (figura 22) para posteriormente generar las mutaciones en la cepa INP-43 y determinar el efecto de la inactivación de cada gen sobre la producción de los factores de virulencia.



7 Discusión.

De acuerdo al análisis *in silico* realizado por Sobrero y Valverde (2020), existen diversos homólogos de la proteína reguladora post-transcripcional RsmA altamente conservada en el género *Pseudomonas*. Entre ellos se encuentra RsmN que a pesar de compartir dominios estructurales y catalíticos con RsmA, su efecto es menor (Morris *et. al.*, 2013), el resto de los homólogos aún no han sido caracterizados. En este estudio realizamos el análisis *in silico* del sistema Rsm en la cepa INP-43 la cual es una cepa virulenta, aislada de un paciente pediátrico, con la característica de que es una mutante en LasR (Mártinez Carranza *et. al.*, 2020) por lo que esta mutación debería modificar la forma en la que regula los factores de virulencia, además, esta cepa sobreproduce piodianina en comparación con la cepa clínica de referencia PAO1 (Mártinez-Carranza *et. al.*, 2020). Encontramos que en el genoma de la cepa INP-43

contiene al gen *rsmA* con 100% de identidad de la secuencia nucleotídica con *rsmA* de la cepa PAO1, a *rsmN* con 98.2% de identidad de la secuencia nucleotídica con *rsmN* de la cepa PAO1. Además, identificamos un homólogo conocido como RsmM exclusivo del linaje de *P. aeruginosa*, el cual presenta una estructura con los dominios catalíticos y estructurales de RsmA (Sobrero & Valverde 2020). RsmM no había sido caracterizado en ninguna cepa. De acuerdo a un estudio previo *in silico* este gen se había hallado en la cepa de *P. aeruginosa* HEXT1, basado en su análisis estructural esta proteína debería presentar la misma función de regulador post-transcriptional que RsmA. Sin embargo, posee un extremo C-terminal que no se encuentra en RsmA, el cual podría tener una función de unión proteína a proteína (Sobrero & Valverde 2020). En este estudio determinamos mediante análisis *in silico* que la proteína RsmM de la cepa INP-43 presenta una secuencia nucleotídica 100% idéntica a RsmM de la cepa HEXT1 y por lo tanto la misma secuencia de aminoácidos, dominios catalíticos y estructurales, por lo que nuestro principal objetivo fue iniciar la caracterización de este gen sobreexpresándolo en la cepa INP-43, así como determinar si es capaz de complementar una mutación en *rsmA* en las cepas PAO1 e ID4365.

Respecto a la regulación en la síntesis de piocianina encontramos que al sobreexpresar a *rsmM* en las cepas PAO1 e ID4365 mutantes en *rsmA*, estas recuperaron el fenotipo silvestre, reduciendo la producción de piocianina, sin diferencias significativas comparando con la cepa silvestre, además la producción de piocianina resultó casi a la mitad de los niveles de piocianina comparado con las mutantes en *rsmA*. Estos resultados nos permiten concluir que RsmM es un regulador negativo de la producción de piocianina similar a RsmA (Pessi *et. al.*, 2001, Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020), por lo tanto, RsmM puede considerarse un homólogo funcional de RsmA. También los resultados indican que si bien RsmM tiene dominios adicionales comparado con RsmA, estos no interfieren en su actividad regulatoria.

Posteriormente, en la evaluación de la producción de elastasa, la sobreexpresión de *rsmM* presentó efectos diferentes en las cepas. En la cepa ID4365 se reportó que la inactivación de *rsmA* reduce la producción de elastasa mientras que la complementación con *rsmA* los restaura (Cocotl-Yanez *et. al.*, 2020). Estos resultados son similares a los obtenidos en este

trabajo. Por otro lado, al evaluar la producción de elastasa cuando se sobreexpresa *rsmM* en la mutante en *rsmA* de la cepa ID4365, esta es significativamente mayor comparada con las mutantes y la cepa silvestre, en más del triple, además, la producción de elastasa también es significativamente mayor cuando se compara con la cepa que sobreexpresa *rsmA*, lo cual no solo demuestra un efecto positivo de *RsmM* en la producción de elastasa, sino que su efecto es mayor al de la sobreexpresión de *RsmA*. En cuanto a la cepa PAO1, estudios previos reportaron que la inactivación de *rsmA* no tiene un efecto aparente en la síntesis de elastasa pero su sobreexpresión la reduce, sugiriendo un efecto negativo (Pessi *et. al.*, 2001). El resultado del nulo efecto de la mutación de *rsmA* sobre la producción de elastasa es similar a nuestros resultados. Adicionalmente, la cepa mutante complementada con *rsmA* tampoco presentó un efecto aparente sobre este factor de virulencia. Por otro lado, contrario a la sobreexpresión de *rsmA*, la sobreexpresión de *rsmM* en la mutante en *rsmA* de la cepa PAO1 provocó una disminución significativa en la producción de elastasa de casi el 90% comparada con la cepa silvestre y sus cepas derivadas, por lo que se puede concluir que *RsmM* sí tiene un efecto negativo en cuanto a la regulación de elastasa en la cepa PAO1. A partir de estos resultados concluimos que *RsmM* es un regulador negativo de la producción de elastasa en la cepa PAO1 pero positivo en la cepa ID4365.

Con respecto a la regulación sobre la producción de ramnolípidos, se obtuvieron resultados diferentes entre las cepas PAO1 e ID4365. En la cepa ID4365 al mutar a *rsmA* la producción de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos se abate esto se confirma con el control de plásmido mutante en *RsmA*, además de que este efecto fue reportado previamente (Cocotl-Yáñez *et. al.*, 2020). El fenotipo se restaura al sobreexpresar a *rsmA* y sucede lo mismo al sobreexpresar a *rsmM*, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan como reguladores positivos de la síntesis de ramnolípidos. Por otro lado, en la cepa PAO1 la mutación y la sobreexpresión de *rsmA* parece no tener ningún efecto en la síntesis de ramnolípidos, contrario a lo que se esperaba de acuerdo con estudios previos en los que se reportó que *RsmA* es un regulador positivo de la síntesis de ramnolípidos (Pessi *et. al.*, 2001). Sin embargo, al no ser este un estudio cuantitativo sino solamente cualitativo no es posible contradecir dicha regulación positiva. Con respecto a la sobreexpresión de *rsmM* en la mutante

en *rsmA* de la cepa PAO encontramos que abate la producción de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos, concluyendo que RsmM tiene un papel como regulador negativo de la síntesis de ramnolípidos en la cepa PAO1. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que RsmM presenta diferencias en regulación de ramnolípidos de acuerdo con la cepa en la que se encuentra, demostrando tener funciones distintas a RsmA.

Por otro lado, también se evaluó el efecto de sobreexpresar a *rsmM* en la cepa INP-43 además de la sobreexpresión de *rsmA* y *rsmN* usando como fenotipo la producción de piocianina. Sin embargo, no se obtuvo un resultado claro debido al efecto provocado por el plásmido vacío pME6032 que elevó los niveles de piocianina. Sin embargo al sobreexpresar a *rsmM* los niveles de piocianina disminuyen a un nivel menor que la cepa silvestre en aproximadamente 80%, por lo que este resultado sugiere que RsmM actúa como regulador negativo en la síntesis de esta fenazina, tal y como sucede en la cepa PAO1 e ID4365. Por otro lado, RsmA parece disminuir de manera significativa los niveles de piocianina a pesar del efecto del plásmido, mientras que la sobreexpresión de *rsmN* supuso un aumento en la producción. Sin embargo, estos datos necesitan ser corroborados con experimentos adicionales ya que no se puede concluir debido a la interferencia del vector vacío. Es importante mencionar que es la primera vez que se evalúa el efecto regulatorio de las proteínas del sistema Rsm en la cepa INP-43.

Finalmente, en este trabajo se construyeron los plásmidos que permitirán, en trabajos posteriores, construir mutantes por reemplazo alélico de los genes por casetes de resistencia.

8 Conclusiones.

Se identificó un homólogo estructural de RsmA en la cepa INP-43 llamado RsmM.

RsmM regula negativamente la producción de piocianina en las cepas ID4365 y PAO1.

RsmM en la cepa ID4365 regula de manera positiva la producción de elastasa y ramnolípidos mientras que en la cepa PAO1 regula de manera negativa la producción de elastasa y ramnolípidos.

RsmM no es solo un homólogo estructural de RsmA sino que además se comporta como homólogo funcional y con un mayor efecto en la regulación de factores de virulencia.

Los resultados obtenidos muestran que RsmM es importante en la regulación de la producción de factores de virulencia.

9 Perspectivas.

Generar las mutantes en *rsmM*, *rsmA*, *rsmN* en la cepa *P. aeruginosa* INP-43, y evaluar la producción de elastasa, piocianina y ramnolípidos.

Complementar las mutantes en *rsmM*, *rsmA* y *rsmN* con *rsmM* en la cepa INP-43 y evaluar la producción de los factores de virulencia elastasa, piocianina y ramnolípidos.

Determinar la función de los dominios adicionales que tiene RsmM.

10 Bibliografía:

Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>

Berra, Lorenzo; Schmidt, Ulrich; Wiener-Kronish, Jeanine (2010). Relationship Between Virulence Factors and Outcome of Ventilator-Associated Pneumonia Related to *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 6(1), 19–25. doi:10.2174/157339810790820458

Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., & O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa*

PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* (Reading, England), 152(Pt 2), 405–418. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28324-0>

Chong, H., & Li, Q. (2017). Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial cell factories*, 16(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>

Cocotl-Yañez, M., Soto-Aceves, M. P., González-Valdez, A., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2020). Virulence factors regulation by the quorum-sensing and Rsm systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural mutant in lasR. *FEMS microbiology letters*, 367(12), fnaa092. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa092>

Coin, D., Louis, D., Bernillon, J., Guinand, M., & Wallach, J. (1997). LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods. *FEMS immunology and medical microbiology*, 18(3), 175–184. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1997.tb01043.x>

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology* (Reading, England), 166(1), 30–33.

Ferreiro, M. D., Nogales, J., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2018). Multiple CsrA Proteins Control Key Virulence Traits in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 31(5), 525–536. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-17-0232-R>

Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (6), 253. <https://doi.org/10.3791/253>

Galloway D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular microbiology*, 5(10), 2315–2321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02076.x>

Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Cámara, M., Williams, P., & Haas, D. (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 186(10), 2936–2945. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.2936-2945.2004>

Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., & Cámara, M. (2018). Differential Regulation of the Phenazine Biosynthetic Operons by Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 252. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>

Huertas-Rosales, Ó., Romero, M., Chan, K. G., Hong, K. W., Cámara, M., Heeb, S., Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M. A., Travieso, M. L., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2021). Genome-Wide Analysis of Targets for Post-Transcriptional Regulation by Rsm Proteins in *Pseudomonas putida*. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 624061. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.624061>

Hunter, R. C., Klepac-Ceraj, V., Lorenzi, M. M., Grotzinger, H., Martin, T. R., & Newman, D. K. (2012). Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 47(6), 738–745. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0088OC> (Retraction published *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019 Jan;60(1):134)

Holmqvist, E., & Vogel, J. (2013). A small RNA serving both the Hfq and CsrA regulons. *Genes & development*, 27(10), 1073–1078. <https://doi.org/10.1101/gad.220178.113>

Iglewski BH. *Pseudomonas*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>

Kanthakumar, K., Taylor, G. W., Cundell, D. R., Dowling, R. B., Johnson, M., Cole, P. J., & Wilson, R. (1996). The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. *Pulmonary pharmacology*, 9(4), 223–230. <https://doi.org/10.1006/pulp.1996.0028>

Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W. R., Rosenbloom, J., & Ohman, D. E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *The Journal of biological chemistry*, 272(15), 9884–9889. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.9884>

Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H.-T. and Haas, D. (2008), Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67: 241-253.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, 10(12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>

Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>

Li, Z., & Nair, S. K. (2012). Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals?. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 21(10), 1403–1417. <https://doi.org/10.1002/pro.2132>

Martínez-Carranza, E., García-Reyes, S., González-Valdez, A., & Soberón-Chávez, G. (2020). Tracking the genome of four *Pseudomonas aeruginosa* isolates that have a defective Las quorum-sensing system, but are

still virulent. *Access microbiology*, 2(7), acmi000132.
<https://doi.org/10.1099/acmi.0.000132>

Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., & Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6454–6465.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001>

McClure, C. D., & Schiller, N. L. (1996). Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. *Current microbiology*, 33(2), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s002849900084>

Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Clément, C., Dorey, S., Sarazin, C., & Rippha, S. (2018). Rhamnolipids From *Pseudomonas aeruginosa* Are Elicitors Triggering Brassica napus Protection Against Botrytis cinerea Without Physiological Disorders. *Frontiers in plant science*, 9, 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01170>

Morris, E. R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V., Lovelock, L., Silistre, H., Messina, M., Cámara, M., Emsley, J., Williams, P., & Searle, M. S. (2013). Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure (London, England : 1993)*, 21(9), 1659–1671. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.07.007>

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*, 55, 165–199.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

Mukherjee S, Jemielita M, Stergioula V, Tikhonov M, Bassler BL (2019) Photosensing and quorum sensing are integrated to control *Pseudomonas aeruginosa* collective behaviors. *PLOS Biology* 17(12): e3000579.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000579>

Newman, J. W., Floyd, R. V., & Fothergill, J. L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS microbiology letters*, 364(15), 10.1093/femsle/fnx124.

Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Cámara, M., Haas, D., & Williams, P. (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 183(22), 6676–6683. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6676-6683.2001>

Pierson, L. S., 3rd, & Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3>

Phenazine Content in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract Negatively Correlates with Lung Function and Microbial Complexity. (2019). *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 60(1), 134.

Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J. A., Marvig, R. L., Haagensen, J., Sommer, L. M., Molin, S., & Johansen, H. K. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature reviews. Microbiology*, 19(5), 331–342.

Sobrero, P. M., & Valverde, C. (2020). Comparative Genomics and Evolutionary Analysis of RNA-Binding Proteins of the CsrA Family in the Genus *Pseudomonas*. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00127>

Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(6), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>

Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2021). The Rhl Quorum-Sensing System Is at the Top of the Regulatory Hierarchy under Phosphate-Limiting Conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 203(5), e00475-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00475-20>

Spagnolo, P., Ryerson, C. J., Putman, R., Oldham, J., Salisbury, M., Sverzellati, N., Valenzuela, C., Guler, S., Jones, S., Wijsenbeek, M., & Cottin, V. (2021). Early diagnosis of fibrotic interstitial lung disease: challenges and opportunities. *The Lancet. Respiratory medicine*, 9(9), 1065–1076.

Veesenmeyer, J. L., Hauser, A. R., Lisboa, T., & Rello, J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Critical care medicine*, 37(5), 1777–1786. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819ff137>

Williams, P., & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current opinion in microbiology*, 12(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>

Yang, H., Liu, M. Y., & Romeo, T. (1996). Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *Journal of bacteriology*, 178(4), 1012–1017. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1012-1017.1996>